

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99816542.5

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 7/04 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 8 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 1267452C

[51] Int. Cl. (续)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

[22] 申请日 1999.9.30 [21] 申请号 99816542.5

[30] 优先权

[32] 1999. 3. 31 [33] IL [31] 129299

[86] 国际申请 PCT/IL1999/000518 1999.9.30

[87] 国际公布 WO2000/058363 英 2000.10.5

[85] 进入国家阶段日期 2001.9.30

[71] 专利权人 莫尔研究应用有限公司

地址 以色列佩塔提克瓦

[72] 发明人 布雷塔·哈地

亚伯拉罕·诺沃格罗斯基

审查员 杨振宇

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

代理人 丁业平 王维玉

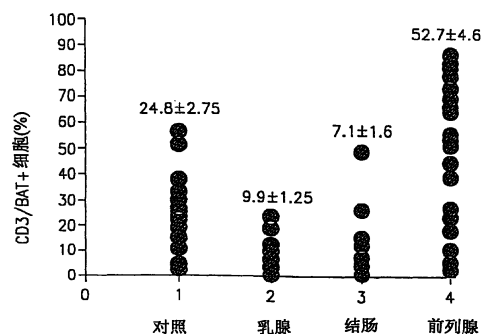
权利要求书 3 页 说明书 34 页 附图 26 页

[54] 发明名称

单克隆抗体、抗原和恶性疾病的诊断和治疗

[57] 摘要

本发明涉及新的针对类淋巴母细胞产生的单克隆抗体 (mAb) 的 DNA 和氨基酸序列以及与所述 mAb 结合的肽。本发明还涉及将所述抗体或肽用于检查出很可能患有恶性疾病的个体,有时用于检查出患有特定恶性疾病的个体的诊断方法。本发明还涉及包括本发明的单克隆抗体或肽的用于治疗不同恶性疾病的药物组合物,以及使用本发明的单克隆抗体或肽治疗恶性疾病的方法。



- 5 1. 一种具有重链可变区和 κ 轻链可变区的单克隆抗体，其中重链可变区和 κ 轻链可变区含有的互补决定区分别与图 1 和图 2 所示氨基酸序列的互补决定区相同。
2. 权利要求 1 的单克隆抗体，其中重链可变区具有图 1 的氨基酸序列。
- 10 3. 权利要求 1 的单克隆抗体，其中 κ 轻链可变区具有图 2 的氨基酸序列。
4. 权利要求 1 的单克隆抗体，其中重链可变区具有图 1 的氨基酸序列， κ 轻链可变区具有图 2 的氨基酸序列。
- 15 5. 权利要求 1 的抗体，是一种嵌合人-小鼠抗体。
6. 一种核酸序列，编码权利要求 1 的单克隆抗体的氨基酸序列。
- 20 7. 一种表达载体，具有权利要求 6 的核酸序列。
8. 权利要求 7 的表达载体，其为 pKN110 质粒。
9. 权利要求 7 的表达载体，其为 pG1D110 质粒。
- 25 10. 一种细胞，其是用权利要求 7-9 所述的表达载体中的任何一种转染的。
- 30 11. 权利要求 1-4 任一项所述的单克隆抗体在制备用于在包含外周血单核细胞（PBMC）的体液样品中诊断恶性疾病的诊断用组合中

的应用，包括：

(a) 使体液样品与所述单克隆抗体接触；

(b) 确定所述单克隆抗体与所述体液样品中的 T 细胞的结合程度；

以及

5 (c) 将(b)中所述的程度和所述单克隆抗体与标准样品中的 T 细胞的结合程度进行比较，上述两种结合程度间存在显著差异表示所述体液样品来自很可能患有恶性疾病的个体。

12. 权利要求 11 的应用，其中在实施(a)步骤之前从体液样品中分离外周血单核细胞 (PBMC)，然后将所述分离的 PBMC 在步骤(a)中
10 与所述单克隆抗体接触。

13. 权利要求 11 的应用，其中所述的体液是血液。

14. 权利要求 1-4 任一项所述的单克隆抗体在制备用于在包含 T
15 细胞的体液样品中诊断很可能患有特定恶性疾病的诊断用组合物中的应用，包括：

(a) 将该体液样品与所述单克隆抗体接触；

(b) 确定该单克隆抗体与所述体液样品中的 T 细胞的结合程度；

20 以及

(c) 将(b)中所述的程度和所述单克隆抗体与取自标准样品的 T 细胞的结合程度进行比较，结合程度间存在显著差异在很大概率上表明所述体液样品来自患有恶性疾病的测试个体，其中与所述体液样品的 T 细胞的结合程度高于或低于所述单克隆抗体与标准样品的 T 细胞的结合水平，表示特定类型的恶性疾病。
25

15. 权利要求 14 的应用，其中所述特定恶性疾病是前列腺癌。

16. 权利要求 14 的应用，其中所述恶性疾病是乳腺癌。

30

17. 权利要求 14 的应用，其中所述恶性疾病是结肠癌。

18. 权利要求 1-4 任一项的单克隆抗体在制备用于治疗癌症的药物组合物中的应用。

5

19. 权利要求 18 的应用，其中所述癌症是实体肿瘤。

20. 权利要求 19 的应用，其中所述实体肿瘤是前列腺癌。

10

21. 权利要求 19 的应用，其中所述实体肿瘤是乳腺癌。

22. 权利要求 19 的应用，其中所述实体肿瘤是结肠癌。

15

23. 一种试剂盒，包括权利要求 1-4 的单克隆抗体中的一种或多种、一种针对该单克隆抗体的特异性结合性配偶体的偶联物、一种能够产生可检测信号的标记物以及使用指南。

单克隆抗体、抗原和恶性疾病的诊断和治疗

5 发明领域

本发明涉及单克隆抗体的新序列、与该单克隆抗体结合的抗原的肽序列，以及利用单克隆抗体和肽的诊断和治疗方法。

发明背景

10 公开号为 No. WO 95/20605，由申请人共同拥有的 PCT 专利申请公开了免疫刺激性单克隆抗体。该 PCT 申请的主题抗体针对 B 类淋巴瘤母细胞而产生并表现出具有免疫刺激的效果。当向发生肿瘤的动物体内注射时，发现这些抗体也具有引发抗肿瘤的效果。

15 在目前的医疗程序下，对癌症的诊断一般是一个涉及身体检查、使用不同的成像技术、使用不同的癌症标示物等的多步骤程序。在癌症的诊断技术领域一直有一个长期的需求，即能够检查出癌症并确定被检查的人员所患癌症的种类。

20 发明的总体描述

本发明的基础是发现了针对类淋巴瘤母细胞的单克隆抗体的序列。本发明的另一个基础是发现了这些抗体同癌症病人的 T 细胞的结合水平与同健康人的 T 细胞的结合水平不同（更高或更低）。

25 根据本发明的一个方面，本发明提供了具有可变区的单克隆抗体，其选自：

(a) 其重链可变区包括图 1 所示氨基酸序列的单克隆抗体；

(b) 其 κ 轻链可变区包括图 2 所示氨基酸序列的单克隆抗体；

(c) 其重链可变区包括图 1 所示氨基酸序列且 κ 轻链可变区包括图

30 2 所示氨基酸序列的单克隆抗体；

(d) 其重链可变区与图 1 所示氨基酸序列具有至少 70%同一性的单克隆抗体；

(e) 其轻链可变区与图 2 所示氨基酸序列具有至少 70%同一性的单克隆抗体。

5

根据本发明，术语“抗体”是指 IgG、IgM、IgD、IgA 和 IgE 类中的任何一类的单克隆抗体。该术语是指完整抗体或包括抗体的抗原结合区的抗体片段，例如缺少 Fc 部分的抗体、单链抗体、基本上仅包括抗体的可变抗原结合区的节 (article) 片段等。

10

此外，本发明还涉及与抗原结合的抗体，上述单克隆抗体中任何一种特异性地与该抗原结合，即与上述抗体具有交叉反应性的抗体。

按照本发明的一个实施方案，所述单克隆抗体是一个嵌合的人-鼠抗体，即具有人源恒定区和鼠源可变区的单克隆抗体 (mAb)。出于此种目的，本发明单克隆抗体的 κ 轻链和重链的可变区以 PCR 法克隆并测定其 DNA 序列。按照本发明的另一个实施方案，抗体是一个完全人源化抗体，即其可变区和恒定区均取自人。

15

“具有至少 X%同一性”术语是指当对序列进行最佳对比时，在两个对比序列中相同的氨基酸残基的比例。因此，70%氨基酸序列同一性是指在两个或多个最佳对比的多肽序列中有 70%的氨基酸是相同的。优选同一性为 80%，最优选为 90%。

20

根据本发明的另外一个方面，提供了产生本发明的任何单克隆抗体的鼠杂交瘤细胞系。杂交瘤可以由本领域中的任何已知技术制备 (例如，Kohler, G. 和 Milstein, C., *Nature*, 256: 495-497, (1975))。杂交瘤细胞系的上清液一般通过本领域的任何已知的方法筛选其抗体结合活性，例如酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 或放射免疫测定法 (RIA)。筛选上清液以制备单克隆抗体，该单克隆抗体同本发明的

25

30

任何肽链（如下文说明）结合或同与之结合的细胞，例如 Daudi 细胞或 T 淋巴细胞相结合。

5 编码上述单克隆抗体的重链或轻链的任何氨基酸序列的 DNA 序列也包括在本发明的范围内。毫无疑问，本领域的任何熟练技术人员都清楚，由于遗传密码的退化性状，多数核酸序列可编码本发明的单克隆抗体，除了图 1 或 2 所示的那些。

10 本发明还提供了例如具有所述 DNA 序列的质粒的表达载体以及包含一个或多个所述表达载体的宿主细胞。

按照本发明的另外一个方面，本发明提供了本发明的单克隆抗体能够与之结合的 B 细胞抗原的肽序列。针对非冗余基因库数据库和 EST 分区所实施的检索表明该肽序列是新的。

15

按照本发明的这一方面，本发明提供了选自下述的肽：

- (a) 具有图 10 所示的氨基酸序列的肽；
- (b) 具有图 11 所示的氨基酸序列的肽；
- (c) 具有图 12 所示的氨基酸序列的肽；
- 20 (d) 与上述 (a)、(b) 和 (c) 肽的氨基酸序列的任何一个具有至少 85% 同一性的肽；
- (e) 包括一个或多个上述 (a) - (d) 肽链的蛋白质或肽。

25 本发明的肽可以用于不同的诊断分析，例如竞争性免疫分析，该分析可以确定本发明的单克隆抗体与存在于 T 细胞上的其天然抗原的结合水平。此外，该肽可以用于在免疫动物体内产生抗体，然后该抗体可以被用于上文或下文所描述的任何一种功能。

30 所有上述肽的类似物也形成了本发明的另外一个方面。正如精通本领域的人员所理解的，可以改变本发明的肽的氨基酸序列，例如，

通过一个或多个氨基酸的添加、缺失或者保守或非保守替换进行，而不会对肽抗体的结合性能产生实质性的改变。

术语“保守替换”是指一种类型的氨基酸被同种类型的氨基酸所替换，其中类型由氨基酸侧链的普通生理化学性质和在自然界中发现的同源蛋白质的高替换频率所限定，例如通过标准 Dayhoff 频率交换基质或 BLOSUM 基质确定。已表征了六种氨基酸侧链基本类型，包括：类型 I（半胱氨酸）；类型 II（丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸、丙氨酸、甘氨酸）；类型 III（天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸）；类型 IV（组氨酸、精氨酸、赖氨酸）；类型 V（异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸、Met）；以及类型 VI（苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸）。例如，以类型 III 中的其他氨基酸残基如天冬酰胺、谷氨酰胺或谷氨酸替换天冬氨酸即为保守替换。术语“非保守替换”是指以一种类型中的氨基酸替换另一种类型中的氨基酸；例如，以类型 III 中的氨基酸残基，如天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸或谷氨酰胺替换类型 II 中的氨基酸残基丙氨酸。

上文（以及下文）所使用的用于指示特定氨基酸（aa）的字母符合由 IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission 所推荐的单字母氨基酸符号。

落入本发明范围的上述肽的类似物与如图 10-12 所示的肽具有实质上相同的与本发明的单克隆抗体结合的水平。结合水平可以以本领域的任何已知的方式确定。

本发明的肽和类似物也可以进行化学修饰，此种经化学修饰的肽和类似物也是本发明的组成部分。术语“化学修饰”是指其中至少一个氨基酸残基通过自然过程如加工或其他翻译后修饰，或者通过本领域中已知的化学修饰技术修饰的蛋白质。在许多已知的修饰中，典型但并不排他的修饰包括：乙酰化、酰化、酰胺化、ADP-核糖基化、糖

基化、GPI 锚形成、与液体或脂质衍生物的共价连接、甲基化、十四烷基化、pegylation、异戊二烯基化、磷酸化、遍在蛋白化或任何类似过程。

5 本发明所基于的第二个发现是本发明的单克隆抗体与取自恶性疾病病人的 T 细胞的结合程度和与取自健康人体的 T 细胞的结合程度不同。

10 因此，本发明的另外一个方面提供了用于识别很可能患有恶性疾病的被检查人员的检查方法，包括：

(a) 从被检查人员获得体液样品；

(b) 将上述样品与本发明的至少一种单克隆抗体接触；

(c) 确定上述单克隆抗体与上述样品中的 T 细胞的结合程度；以及

15 (d) 将 (c) 项中的结合程度和本发明的单克隆抗体与取自健康个体的样品中的 T 细胞的结合程度进行对比；上述两项结合程度的显著差异表明该被检查人员是很可能患有恶性疾病的。

20 根据本发明，取自被检查个体的样品可以是包括可检测数量的 T 细胞的任何体液。典型地，体液样品是血液样品或淋巴液样品。优选在将本发明的单克隆抗体与所取得的样品接触前，通过一种本领域中已知的方法，例如 Ficoll Hypaque 密度离心法将样品中的外周血单核细胞 (PBMC) 分离出去，分离出来的细胞然后被用于与检测抗体的接触。

25

本发明中的术语“恶性疾病”应理解为本领域已知的处于任何阶段的任何种类的恶性疾病。

30 该术语也包括处于其早期阶段，尚未表现出临床症状的恶性疾病。该术语优选指的是实体肿瘤。

术语“健康个体”是指没有患上恶性疾病的人，也可以指几个个体的平均水平，或者指将取自几个个体的体液进行混合后得到的水平。应该注意的是，一旦建立起健康个体结合程度的标准数据，则没有5 有必要为每一次检查重新建立该标准数据，并可以连续使用已建立的数据。根据本发明，发现在健康个体中，大约 25%的 CD3⁺ T 细胞与本发明的抗体结合。

术语“很可能”系指本发明的检查是一种能够识别出怀疑患有恶性10 疾病的个体的初步筛选检查。通过本发明的方法所检查的个体确实患有恶性疾病的事实还需要通过本领域已知的其他技术在以后证实。

术语“结合程度”涉及抗体与被检查个体的 T 细胞上存在的抗原的结合水平，该程度可以通过本领域中已知的确定抗体的结合水平的任何方法15 确定，例如 ELISA 或 Western Blotting。可以使用任何检测系统确定结合程度，例如使用与一种可检测的标记物连接的抗小鼠免疫球蛋白或其片段。此类可检测的标记物的例子是放射性基团、发荧光的基团、能够催化产生可检测产物的反应（例如一种颜色反应）的酶、能够通过抗生物素蛋白被检测到的生物素基团等。在一个优选的20 实施例，本发明的单克隆抗体与 T 细胞的结合程度通过一种双重标记的方式测定，其中在抗 T 细胞抗体（例如，抗-CD3⁺抗体）上连接一种发荧光的标记物，在本发明的单克隆抗体上连接另一种发荧光的标记物。然后使用荧光素活化细胞分选仪（FACS）确定结合程度。结合程度的定量通过确定 CD3⁺ T 细胞的百分比得到（由其与抗 CD3⁺25 抗体的结合确定），所述 T 细胞也与本发明的单克隆抗体相结合。

根据本发明，发现在患有恶性疾病的个体的血液样品中的 CD3⁺30 细胞的总数与取自健康个体的血液样品的 CD3⁺细胞的总数类似，因此，使用患有恶性疾病的个体和健康的个体中 CD3⁺结合性 T 细胞的总数对单克隆抗体和 CD3⁺ T 细胞二者的结合程度进行标准化均是有

5 效的。然而，在患有恶性疾病的个体中 CD3⁺结合性 T 细胞（该 T 细胞也与本发明的单克隆抗体结合，以下称：“CD3⁺ mAb 细胞”）的百分比与健康个体血液中的 CD3⁺ mAb⁺ 细胞百分比有显著差异。患有恶性疾病的个体中的 CD3⁺ mAb 细胞的百分比可能显著高于或显著低于健康个体中的 CD3⁺ mAb⁺ 细胞百分比，这取决于恶性疾病的类型。

10 当如由在此所提到的实验方法获得的结果连同本领域中任何已知的统计方法（例如，斯氏 t 检验）所确定的，本发明的单克隆抗体与取自被检查个体的 T 细胞的结合程度和与取自健康个体的 T 细胞的结合程度相比在统计学上存在显著程度的差异时，则认为所述单克隆抗体的结合程度之间存在“显著差异”。

15 本发明不但能够识别很可能患有任何类型的恶性疾病的个体（其中，患病个体的 T 细胞与本发明的单克隆抗体的结合程度与健康个体相比是不同的），而且能够通过确定上述结合程度比健康个体中相应的结合程度高或低而帮助识别患有特定类型的癌症的个体。

20 典型地，本发明的单克隆抗体与取自健康个体的 T 细胞的结合百分比在大约 25% 的范围，即，表达 CD3⁺ T 细胞标记物的细胞中的 25%（由抗 CD3⁺ 抗体与细胞的结合确定）也与本发明的单克隆抗体结合。

根据本发明，已表明在取自前列腺癌症病人的样品中，与本发明的单克隆抗体结合的 CD3⁺ T 细胞的百分比在约 50% 的范围内。

25 还进一步表明，当 CD3⁺ T 细胞来自取自结肠或乳腺癌病人样品时，与本发明的单克隆抗体结合的细胞百分比分别是约 7% 和 10%。

30 因此，根据本发明，使用以本发明的单克隆抗体与体液样品中的 CD3⁺ 细胞的结合程度作为基础的简单且单一的检查即有可能确定在取自被检查个体的体液样品中很可能存在特定类型的癌。本发明诊断方

法的简易性，即仅需要使用一种单克隆抗体来识别患有某一类型的癌症的个体，对于人群的大范围筛查是非常有用的。

5 因此，本发明的另一个方面提供了一种识别很可能患有特定恶性疾病的被检查个体的分析方法，包括：

(a) 从上述个体中取得体液样品；

(b) 将上述样品与本发明的单克隆抗体接触；

(c) 确定上述单克隆抗体与上述样品中的 T 细胞的结合程度；和

10 (d) 将 (c) 项中所获得的细胞结合程度和单克隆抗体与取自健康个体的 T 细胞的结合程度进行对比，在结合程度上存在显著差异表明被检查个体很可能患有一种恶性疾病，其中单克隆抗体与取自上述个体的 T 细胞的结合程度高于或低于与取自健康个体的 T 细胞的结合程度表明被检查个体很可能患有一种特定类型的恶性疾病。

15 特别地，当与本发明的单克隆抗体的结合程度显著高于健康个体中的结合程度时，被检查个体很可能患有前列腺癌。

当结合水平显著低于健康个体时，被检查个体很可能患有结肠癌或乳腺癌。

20

根据本发明的诊断方面，包括本发明的单克隆抗体的组合物可以被用于识别很可能患有一种恶性疾病（通常意义）的个体或被用于识别该个体可能患的特定恶性疾病的诊断。因此，本发明的另一个方面提供了包括属于至少一种上文所提到的抗体的单克隆抗体及适当的载体的诊断组合物。载体可以是可溶性载体，例如本领域中已知的任何一种生理上可以接受的缓冲液（例如，PBS），也可以是固态的载体，例如乳胶珠。

25

30 本发明还提供了试剂盒，例如使用本发明的单克隆抗体并进行上文所公开的诊断分析的诊断分析试剂盒。在一个实施方案中，诊断试

剂盒通常包括在一个或多个容器中的至少一种上述单克隆抗体，单克隆抗体的特定结合配偶体的偶联物（例如本发明的抗原或类似物），能够产生可测信号的标记物以及使用指南。根据推理，标记物可以与单克隆抗体结合，或者，标记物可以与载体分子结合，载体分子再与单克隆抗体特异性地结合。被测试样品与诊断试剂组分的温育时间应足以使单克隆抗体与细胞结合。

本发明的另一个方面提供了药物组合物，其组分包括作为活性组分的本发明的一种或多种单克隆抗体。上述单克隆抗体在制备用于治疗个体的不同恶性疾病的药物制剂中的应用也在本发明的保护范围内。

本发明的另一个方面涉及一种通过向需要的个体给予治疗有效量的上述单克隆抗体而对恶性疾病进行治疗的治疗方法。治疗有效量是指能够减轻恶性疾病的症状、减少或完全消除症状的量。

包括本发明的肽的药物组合物也构成了本发明的一个方面。该药物组合物可以用于，例如刺激个体的免疫功能以获得抗体，然后该抗体与个体的 T 细胞结合并诱发个体的免疫应答。

本发明内容的详细描述

下面将在随时引用附图的情况下描述本发明的主要方面。在下面的描述和附图中，术语“BAT 抗体”将与术语“本发明的单克隆抗体”交互使用。

对附图的简要说明

图 1 表示本发明的单克隆抗体的重链可变区的 DNA 和肽序列；

图 2 表示本发明的单克隆抗体的 κ 轻链可变区的 DNA 和肽序列；

图 3 是对本发明的抗体的重链可变区的氨基酸序列分析（标为“BAT”，“BAT”限定了 BAT 抗体 V_H区的氨基酸序列，而“VMS2”

限定了种系 VMS2/VGK4 的种系基因的氨基酸序列。当 BAT 序列与种系序列相同时，种系序列以点 (.) 代替；当发生错配时，标明不同的种系残基。下面的表及后续页中的序列描述了在 Kabat 等人的 Sequences of proteins of immunological interest(1991)所述的小鼠重链亚型杂集（小鼠 V_H Misc.）及更大的全部已知的小鼠 V_H 序列数据库中在特定的残基位置观察到的特定氨基酸的出现频率）；

图 4 是对本发明的抗体的κ轻链可变区的氨基酸序列分析（在图中标为“BAT”）。“小鼠”限定了 BAT 抗体 K_κ区的氨基酸序列，而“种系”限定了种系 H4 种系基因的氨基酸序列。当 BAT 序列与种系序列相同时，种系序列以点 (.) 代替；当发生错配时，标明不同的种系残基。下面的表及后续页的内容描述了在 Kabat 小鼠重链亚型 VI（小鼠 V_κ VI）及更大的全部已知的小鼠 V_κ 序列所有小鼠 V_κ 数据库中在特定的残基位置观察到的特定氨基酸的出现频率；

图 5 表示本发明嵌合抗体的κ轻链可变区的 DNA 和肽序列；

图 6 表示本发明嵌合抗体的重链可变区的 DNA 和肽序列；

图 7 是对用于表达本发明嵌合抗体的κ轻链的 pKN 110 哺乳动物表达载体的示意性描述；

图 8 是对用于表达本发明嵌合抗体的重链的 pG1D 110 哺乳动物表达载体的示意性描述；

图 9 是对以 ELISA 分析法对鼠和本发明的 γ 1/κ 嵌合抗体与 Daudi 细胞的结合特性的测定结果的一个例子的图示；

图 10 表示本发明的肽 1 的氨基酸序列；

图 11 表示本发明的肽 2 的氨基酸序列；

图 12 表示本发明的肽 3 的氨基酸序列；

图 13 是对以 FACS 分析法确定的在取自健康个体的血液样品中，与本发明的单克隆抗体（以“BAT”表示）结合的 CD3⁺细胞占 CD3⁺细胞总数的百分比的示意性描述；

图 14 表示以 FACS 分析法确定的在取自患有结肠癌的病人的血液样品中，与本发明的单克隆抗体（以 BAT 表示）结合的 CD3⁺占 CD3⁺细胞总数的百分比；

图 15 表示在取自乳腺癌的病人的血液样品中，与本发明的单克隆抗体（以 BAT 表示）结合的 CD3⁺细胞占 CD3⁺细胞总数的百分比；

图 16 表示在取自前列腺癌的病人的血液样品中，与本发明的单克隆抗体（以 BAT 表示）结合的 CD3⁺细胞占 CD3⁺细胞总数的百分比；

5 图 17 表示与乳腺癌、结肠癌或前列腺癌病人相比，在健康个体中，与本发明的单克隆抗体（以 BAT 表示）结合的 CD3⁺细胞平均百分比的图示；

图 18 是取自前列腺癌、耳鼻喉（ENT）癌、乳腺癌病人 T 细胞或取自 Daudi 细胞的膜的肽的蛋白质印迹（Western Blot）的照片。将印迹与本发明的单克隆抗体温育，表明取自前列腺癌病人的 T 细胞中的抗原数量增加，而取自乳腺癌病人的 T 细胞的抗原水平检测不到。

I. 单克隆抗体的测序

(A) 缩写

15 胎牛血清（FCS）；核糖核酸（RNA）；信使 RNA（mRNA）；脱氧核糖核酸（DNA）；复本 DNA（cDNA）；聚合酶链反应（PCR）；分钟（min）；秒（sec）；Tris-硼酸盐缓冲液（TBE）。

(B) 原料

20 培养基成分及所有其他组织培养材料取自 Life Technologies（UK）。RNA 分离试剂盒取自 Stratagene（USA），而 cDNA 的第一条链合成试剂盒从 Pharmacia（UK）购买。包括 AmpliTaq® DNA 聚合酶在内的所有 PCR 反应组分和设备均向 Perkin Elmer（USA）购买。TA Cloning® 试剂盒获自 Invitrogen（USA）。琼脂糖（UltraPure™）来自 Life Technologies（UK）。Thermo Sequences™预混合循环测序试剂盒及 Vistra 725 DNA 测序仪均购自 Amersham（UK）。所有其他分子生物学产品均来自 New England Biolabs（USA）。

(C) 实验技术：PCR 克隆及小鼠 BAT 抗体可变区基因的克隆和测序

30 将小鼠 BAT 杂交瘤细胞系和 Daudi 细胞系成功地转移至 MRC-

CC, 两种细胞系均在悬浮液中生长, 悬浮液使用 RPMI (不含谷氨酰胺) 并添加 10% (v/v) FCS, 100 单位/ml 青霉素, 100 μ g/ml 链霉素和 2mM L-谷氨酰胺, 1mM 丙酮酸钠和 12.5 单位/ml 制霉菌素。

5 收获 BAT 杂交瘤细胞系的大约 10^8 个活细胞, 按照制造商的指示使用 RNA 分离试剂盒将总 RNA 从这 10^8 个细胞中分离出来。试剂盒使用如 Chromczynski 和 Sacchi 在 *Anal. Biochem.*, 162: 156, 1987 中所描述的硫氢酸胍苯酚-氯仿单步骤提取程序。仍然按照制造商的指示, 利用第一条链 cDNA 合成试剂盒, 使用试剂盒所提供的 NotI-(dT)₁₈ 引物产生 BAT 杂交瘤 mRNA 的单链 DNA 拷贝。在每 33 μ l 最终反应体积中使用大约 5 μ g 总 RNA。然后将最终反应混合物在 90°C 加热 5 分钟, 以使 RNA-cDNA 双链体变性并使反转录酶失活, 然后在冰上冷却。

15 为 PCR 扩增来自杂交瘤细胞系的小鼠重链可变区基因 (V_H 基因) 及小鼠 κ 轻链可变区基因 (V_κ 基因), 使用 Jones 和 Bendig 在 *Bio/Technology*, 9:8, 1987 中所描述的方法。实质上, 使用两组简并引物, 一组设计用于和小鼠重链基因的前导序列 (即 MHV1-12; 表 1) 退火, 另一组设计用于和小鼠轻链基因的前导序列 (即 MKV1-11; 表 2) 退火, 它们与设计用于和合适的恒定区基因的 5'端退火的引物一起用于 PCR 克隆鼠可变区基因。

25 在特殊的 PCR-室 (PCR-room) 中使用为尽可能减少交叉污染的可能而特别设计的程序, 用其合适的恒定区引物准备针对每种简并引物的单独 PCR 反应。在各种情况下, 使用 Amplitaq® DNA 聚合酶扩增模板 cDNA。然后将 PCR 反应管放入 Perkin Elmer 480 DNA 循环变热加温器中进行每次 94°C 下 1 分钟和 72°C 下 1 分钟的循环加温, 循环 25 次 (在最初以 94°C 解链 1.5 分钟之后)。在最后一个循环完成时, 在 72°C 下实施最后的延伸步骤 10 分钟, 然后将反应物冷却至 4 °C。除在退火 (50°C) 和延伸步骤 (72°C) 之间使用的持续的间隔时

30

间 (ramp time) 为 2.5 分钟之外, 在每个循环步骤之间应用 30 秒的间隔时间。

5 取自每个 PCR 反应的 10 μ l 等份样品在 1%的琼脂糖/TBE (pH 8.8) 胶上走柱, 以确定哪个反应产生了合适大小的 PCR-产物。那些看起来确实扩增了全长可变区基因的 PCR 反应被重复进行, 以产生独立的 PCR 克隆并因此减少 PCR-错误的效果。那些适当大小的 PCR 产物的 1-6 μ l 等分样品被直接克隆至 TA Cloning®试剂盒所提供的 pCRII™载体中, 并按照制造商的指示转化至 INA α F'感受态细胞中。
10 按照 Güssow 和 Clackson 在 *Nucleic Acid Res.*,17:4000,1989 中的方法使用下面的表 3 所示的 pCRII 正向和 pCRII 反向的寡核苷酸引物对集落进行 PCR 筛选, 从而识别含有具有适当大小的插入子的质粒的集落。

15 那些所识别的假定的阳性克隆是双链质粒 DNA, 使用 Vistra DNA 测序仪以及按照制造商的说明书的描述使用 Thermo Sequenase™预混合循环测序试剂盒对其进行了测序。

实施例 1: BAT 抗体重链可变区的克隆和测序

20 如同所有人源化的项目, 采用严格的 PCT 克隆和测序程序。这样做是为了尽可能降低向来自 BAT 杂交瘤细胞系的鼠 V_H 可变区基因的野生型序列引入错误的可能。只有在来自至少两个不同的来自表达鼠 BAT 抗体的杂交瘤细胞系的 V_H 基因克隆的所有 DNA 序列数据均完美地匹配时, 该基因序列才被作为正确的序列接受。

25

对来自不同的总 RNA 制剂和后续第一链 cDNA 合成反应的三种单独的 PCR 产物, 进行 PCR 克隆并在两条链上进行完全的 DNA 测序。虽然测试了全部 12 个重链引物 (表 1), 只有 MHV9 引物 (与 MHC3 一起被设计用于小鼠 γ^3 重链基因的 CH₁ 域的退火) 得以 PCR 扩增,
30 得到一种大约为 460bp 的产物, 然后将其 TA-克隆进 pCRII™克隆载

体（未列数据）。

对分别来自三种 PCR 产物（每种产物来自不同的第一链合成反应和后续的 PCR 反应）的几个单独的克隆的 DNA 序列分析最终确定了 BAT 抗体重链可变区的序列，如图 1 所示。这一序列在所研究的全部三种 PCR 克隆中的 DNA 双链上得到证实。

实施例 2：BAT 抗体的 κ 轻链可变区的克隆和测序

使用一系列 κ 轻链简并引物使通过第一链合成反应产生的单链 cDNA 模板得到 PCR 扩增（下文的表 2）。然而，这导致来自不止一种简并引物的 PCR 产物被扩增，表明不止一个可变区基因至少通过杂交瘤细胞系被转录。

首先，当 MKV2 引物（与 MKV 系列引物一样与信号肽 κ 轻链的 DNA 序列 5'端退火）和 MKC（设计用于与小鼠 κ 恒定区基因 5'端退火）一起使用时，观察到一种 PCR 产物。以前的内部实验告诉我们 MKV2 引物会 PCT 扩增一种异常的 mRNA 转录物。这种异常的假基因出现在衍生自原始的 MOPC-21 浆细胞瘤细胞系的所有标准的融合配偶体中，并被称为 MOPC-21（Deyev, S.M.等人, *Genetica*, 85: 45, 1991）。NO-0 是一种衍生自 MOPC-21 系的细胞系，正是这一细胞系被作为用于产生 BAT 杂交瘤的融合配偶体。因此，当使用 MKV2 引物时观察到 PCR 产物并不希奇。分析这一产物，表明其是非功能性假基因（未列举数据）。

奇怪的是，以前被认为被相关的细胞系 NS-1（Hamlyn, P.H., 等人, *Nucl. Acis., Res.*, 9: 4485, 1981）所分泌并在同时使用 MKV7 引物和 MKC 引物时正常 PCR 克隆的另一种假基因在目前已分析的任何 PCR 产物中均没有观察到。由于 NS-1 和 NS-0 细胞系具有高度的相关性，这就有一点奇怪。然而，这也表明存在于 BAT 杂交瘤细胞系中的 κ 轻链转录的混乱性。

最终成为 BAT 抗体的 V_{κ} 基因的另外一种 PCR 克隆，利用 MKV5 引物和 MKC 引物也被从 BAT 杂交瘤细胞系成功地 PCR 扩增。随着大约 450bp 产物转化到 $INV\alpha F'$ 感受态细胞中，使用 PCR 筛选分析识别出推定的阳性转化体，然后对其 DNA 测序。

根据对 MKV5 产物的两个单独的克隆（每种来自不同的第一链合成反应和后续 PCR 反应）的序列分析，确定了 BAT 抗体 κ 轻链可变区基因的 DNA 序列（图 2）。这一序列被又一次在每个克隆中的两条 DNA 链上证实。

实施例 3 鼠 BAT 抗体可变区的序列分析

将 BAT V_{κ} 和 V_H 区的氨基酸序列与在 Kabat (Supra) 数据库中所显示的鼠可变区亚型的共有序列进行比较。通过这种分析，发现 BAT V_H 区与小鼠 κ 亚型 VI 的共有序列最匹配。对 BAT V_H 区与 Kabat 数据库的类似比较发现其表现出与小鼠重链亚型“杂集”的共有序列的最佳匹配。

将上述 BAT 抗体的可变区序列与鼠种系数据库比较，发现与 BAT V_H 基因最近的种系基因是 VMS/VGK4（图 3），而与 BAT V_{κ} 基因最近的种系基因是 H4（图 4）。正如图 3 所示，发生在 BAT V_H 基因与其最近的种系基因之间的错配毫不奇怪地主要位于 CDR2 和 CDR3。只有三处构架改变，均位于 FR3。关于 BAT V_{κ} 基因（图 4），仍然毫不奇怪的是，多数错配均位于 CDR。四种位于 FR 的改变，除在 FR3 的第 72 位点（Kabat 编号）的半胱氨酸外均为高度保守性的改变。其紧邻着一个重要的规范残基（第 71 位点）的位置表明半胱氨酸可能在抗原的结合中扮演着重要的角色。然而，只有通过模拟 Fv 域，这一假定才会被澄清。

尽管如此，这些分析仍然证实小鼠 BAT 可变区的 V_H 和 V_{κ} 区是

表 3 用于 PCR 筛选转化集落的引物

	名称	序列 (5' → 3')
5	pCRII 正向引物(18 聚体)	CTAGATGCATGCTCGAGC
	pCRII 反向引物(21 聚体)	TACCGAGCTCGGATCCACTAG

II. 本发明嵌合抗体的构建和表达

(A) 缩写

10 使用了下列非国际标准单位的单位和其他缩写：

聚合酶链反应(PCR)；脱氧核糖核酸(DNA)；复本 DNA(cDNA)；
 κ 轻链可变区 (V_{κ})；重链可变区 (V_H)；分钟 (min)；Tris-硼酸盐
 缓冲液 (TBE)；磷酸盐缓冲盐溶液 (PBS)；室温 (RT)；牛血清
 15 白蛋白 (BSA)；盐酸 (HCl)；辣根过氧化物酶 (HRP)；低脂牛
 奶 (LFM)；小时 (hr)；百分比 (%)；邻苯二胺二盐酸 (OPD)；
 多克隆位点 (MCS)。

(B) 原料

培养基成分及所有其他组织培养材料取自 Life Technologies
 20 (UK)。包括 AmpliTaq®DNA 聚合酶在内的 PCR 反应组分购自 Perkin
 Elmer (USA)。TA Cloning ®试剂盒及 INV α F'感受态细胞来自
 Invitrogen (USA)。DH5 α 感受态细胞和琼脂糖 (UltraPure™) 来自
 Life Technologies (UK)。Thermo Sequenase™预混合循环测序试剂盒
 及 Vistra 725 DNA 测序仪均购自 Amersham (UK)。用于 ABI Prism 310
 25 Genetic Analyzer 的 Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready
 Reaction Kit 购自 PE Applied Biosystems(UK)。所有其他提到的分子
 生物学产品均来自 New England Biolabs (USA) 或 Promega (USA)。
 Nunc-Immuno Plate MaxiSorp™ 免疫板购自 Life Technologies (UK)，
 而 Corning 易清洗 ELISA 板购自 Corning Laboratory Sciences Company
 30 (UK)。山羊抗人 IgG (Fc γ 片段特异性) 抗体、山羊抗人 κ 轻链/HRP

偶联物以及 AffinPure 山羊抗人 IgG (Fc_v 片段特异性) /HRP 偶联物购自 Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (USA)。K-Blue TMB 底物和 Red Stop 溶液购自 Neogen Inc. (USA)。所有其他用于 ELISA 的产品均来自 Sigma (UK)。Microplate Manager® 数据分析软件包购自 Bio-Rad (UK)。微量搅拌超滤盒和 PM30 过滤膜来自 Amicon PLC (UK)，而 Immunopure® (G) IgG 纯化试剂盒购自 Pierce PLC (UK)。

(C) 实验技术

C1 嵌合 $\gamma 1/\kappa$ BAT 抗体的构建

10 使用特别设计的 PCR 引物 (表 1) 在 5'端和 3'端修饰已经分离的小鼠 κ 轻链可变区 (V_{κ}) 基因 (图 1) 和重链可变区 (V_H) 基因 (图 2)，使得在哺乳动物细胞中 BAT 可变区基因表达为小鼠-人嵌合抗体的一部分。为实现这种分离，在一种特定的 PCR-室中使用设计用于尽可能减少交叉污染可能的特定程序准备每个可变区基因的 PCR 反应。

15 使用质粒 BATV_H-pCR2.1 和 BAT V _{κ} -pCR2.1 作为模板并使用 AmpliTaq® DNA 聚合酶扩增这些模板。引物 B8814 和 B8815 (表 4) 被用于 BAT V_H 基因的 PCR 修饰，而引物 C0224 和 C0225 (表 4) 被用于 BAT V _{κ} 基因的 PCR 变异。

20 将 PCR 反应管在 94°C 下 50 秒和 72°C 下 1 分钟 30 秒循环加温，循环 30 次 (在最初以 94°C 解链 3 分钟后)。在最后一个循环完成时，在 72°C 下实施最后的延伸步骤 10 分钟，然后将反应物在冰上冷却。从每个 PCR 反应中取 5 μ l 等份样品在 1.2% 的琼脂糖/TBE (pH 8.8) 胶上走柱，以确定哪个反应产生了合适大小的 PCR-产物。

25

那些适当大小的 PCR 产物的 1-2 μ l 等分样品被直接克隆至由 TA Cloning® 试剂盒所提供的 pCR2.1™ 载体中，并按照制造商的指示转化至 INA α F' 感受态细胞中。按照 Güssow 和 Clackson (同上) 的方法使用 1212 和 1233 寡核苷酸引物 (表 5) 对集落进行 PCR 筛选，从而

30 识别含有具有适当大小插入子的质粒的集落。那些识别出的假定的阳

性克隆是双链质粒 DNA，使用 Vistra DNA 测序仪及 ABI Prism 310 Genetic Analyzer 测定了其序列。按照制造商的说明书的描述使用 Thermo Sequenase™ 预混合循环测序试剂盒和 Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 和引物 1212 和 1233（表 5）。

5

将那些含有正确修改的 BAT V_{κ} 和 V_H 基因（分别见图 5 和图 6）的克隆作为 HindIII-BamHI 片段分别亚克隆至表达载体 pKN110（图 7）和 pG1D110（图 8）中，以在哺乳动物细胞中表达嵌合轻链和嵌合重链。然后将连接的表达载体（即 pKN110-BAT V_{κ} 和 pG1D110-BAT V_H ）
10 转化至 DH5 α 感受态细胞中。含有正确构建的表达载体的阳性克隆最终通过限制酶切消化分析来识别。

C2 嵌合 $\gamma 1/\kappa$ BAT 抗体载体 DNA 共转染至 COS 细胞中

按照 Kettleborough 等人的方法将哺乳动物表达载体转染至 COS
15 细胞中。简要地说，将 DNA（10 μ g κ 轻链表达载体 pKN110-BAT V_{κ} 和 10 μ g 重链表达载体 pG1D110-BAT V_H ）加入到每毫升 PBS 含有 1×10^7 个细胞的 0.70ml 等分试样中，使用 Bio-Red Cene Pulser 仪在 1900V，25 μ F 电容下给予脉冲电流。在室温下恢复 10 分钟后，将经电穿孔的细胞加入 8ml 含有 5%FCS 的 DMEM 中并在 37°C 下在 5%的
20 CO₂ 中温育 72 小时。温育 72 小时后，收集培养基，旋转以移去细胞碎片并使用 ELISA 分析嵌合 BAT 抗体的产率。

C3 通过 ELISA 对嵌合 $\gamma 1/\kappa$ BAT 抗体定量

首先以 100 μ l 含有 0.4ng/ μ l 的山羊抗人 IgG（Fc $_{\gamma}$ 片段特异性）
25 抗体的等分试样包被 96 孔 Nunc-Immuno Plate MaxiSorp™ 免疫板的每个孔，以 PBS 稀释并在 4°C 下温育过夜，并在使用前取出。然后在免疫板上加上 100 μ l/孔等分的实验样品（即收获的 COS 细胞上清液——旋转以移去细胞碎片）以及 1:2 的样品稀释液（在样品酶偶联物缓冲液，即 0.1M Tris-HCl(pH 7.0)、0.1M NaCl、0.02% (v/v) TWEEN-20
30 和 0.2% (w/v) BSA 中稀释）。此外，作为标准物使用的并按照 1:2

连续稀释的纯化的人 $\gamma 1/\kappa$ 抗体 (1000ng/ μ l) 也被加入到免疫板上。免疫板在 37°C 下温育 1 小时, 然后以 200 μ l/孔的洗涤缓冲液(PBS/0.1% (v/v) TWEEN-20) 洗涤三次。向每个孔中加入 100 μ l 在样品-酶偶联物缓冲液中稀释 5000 倍的山羊抗人 κ 轻链/辣根过氧化物酶偶联物, 然后在 37°C 下将免疫板温育 1 小时, 再按照前面的内容洗涤。向每个孔中加入 150 μ l K-Blue 底物等分样品, 然后免疫板在室温下在黑暗中温育 10 分钟。最后通过向每个孔中加入 50 μ l Red Stop 终止反应。然后使用 Bio-Rad 3550 微量培养板读数器结合 Microplate Manager® 软件包确定在 655nm 的光密度。

10

C4 嵌合 BAT 抗体的纯化

嵌合 BAT $\gamma 1/\kappa$ 抗体从 COS 细胞上清液中通过两个步骤纯化。首先, 按照制造商的指示使用具有 PM30 过滤膜的微量搅拌超滤盒, 以减少未纯化的粗品上清液的体积。然后仍然按照制造商的指示使用 Immunopure®(G)IgG 纯化试剂盒从浓缩的上清液中亲和纯化嵌合 BAT 抗体。

15

C5 Daudi 细胞 ELISA

使用由 Dr.Hardy (Felsenstein Medical Research Center, Rabin Medical Center, Beilinson Campus, Petach Tikva, 49100, Israel) 培养自原液的 Daudi 细胞实施细胞 ELISA 分析。根据所分析的是小鼠或小鼠-人嵌合 BAT 抗体对分析方法进行细微的调整。在分析小鼠 BAT 抗体的结合亲和力时, 使用山羊抗小鼠 IgG (Fab 特异性) /HRP 偶联物 (1: 15000 稀释) 作为第二抗体。相反地, 当测量嵌合 BAT 抗体时, 使用 AffiniPure 山羊抗人 IgG (Fc_{γ} 片段特异性) /HRP 偶联物 (稀释 1000 倍)。

25

将 Daudi 细胞 (传代 2 天后) 首先以 10^5 细胞/孔涂布在 96 孔的 Corning 易清洗 ELISA 板中, 然后在干燥的培养箱中在 37°C 下温育过夜。第二天, 向每个孔中加入 200 μ l 再水合缓冲液 (含有 10%FCS 和

30

0.05%叠氮化物的 PBS)，然后静置至少 1 小时。滌去再水合缓冲液，向培养板的每个孔中加入不同的 1: 2 连续稀释的纯化 BAT 抗体的 50 μ l 等分样品。再一次在 4°C 下温育培养板过夜，以含有 5%LFM 的 PBS 以 200 μ l/孔洗涤两次，使干。此后向每孔加入 50 μ l HRP 偶联的第二抗体，实施一连串的区别性六种洗涤（即一次以含有 5%LFM 的 PBS 洗涤，三次以加入 0.05%TWEEN-20 的同样的缓冲液洗涤，还有两次以 PBS/LFM 缓冲液洗涤）。向每孔加入溶于 0.05M 柠檬酸缓冲液（pH 5.0）的 0.4mg/ml OPD 底物和 60mg/ml 过氧化氢 200 μ l，在室温下在黑暗中温育 ELISA 板直至出现颜色（通常约 30 分钟）。最后，向每孔中加入 50 μ l 2.5M 的硫酸以终止反应，然后使用 Bio-Rad 3550 微量培养板读数器结合 Microplate Manager®软件包确定在 490nm 的光密度。

结果

15 实施例 4 嵌合 $\gamma 1/\kappa$ BAT 抗体的构建

如同所有项目，本实施例遵守了严格的 PCR 克隆和测序程序。这样做是为尽可能减少在 PCR 修饰步骤中向小鼠可变区基因野生型序列中引入错误的可能性。使用引物 C0224 和 C0225（表 1）通过 PCR 修饰小鼠 BAT V_{κ} 基因（图 2）产生一条 418bp 的带（未列数据）。这一 PCR 产物被连接到 pCR2.1 质粒并转化到 INV α F'感受态细胞中。类似地，使用引物 B8814 和 B8815（表 1）使小鼠 BAT V_H 基因（图 1）PCR 突变产生一条 436bp 的带（未列数据）。这一 PCR 产物也被连接到 pCR2.1 质粒并转化至 INV α F'感受态细胞中。

25 然后使用 PCR 筛选分析（未列数据）检测推定的阳性转化体，最后在 ABI Prism 310 Genetic Analyzer 上进行双链 DNA 测序。图 3 和图 4 分别表示该嵌合 BAT V_{κ} 基因和 BAT V_H 基因的 DNA 序列分析结果。该分析的実施既是为了确认其成功的诱变也是为了表明可能被引入基因中的任何 PCR 错误的存在。针对每种可变区基因只有一种 PCR 反应实际发生并且只有来自每种 PCR 反应的两个克隆最终是完

成整的 DNA 序列。

尽管如此，这仍足以从每种含有正确修饰的 DNA 序列的经修饰的可变区基因中分离出至少一种克隆。

5

突变的 V_H 和 V_K 基因然后作为 $hindIII/BamHI$ 片段被亚克隆至适当的表达载体中以分别产生 $pKN110-BATV_K$ (7.88kb) 和 $pG1D110-BATV_H$ (7.55kb)。所构建的表达载体的保真性然后通过限制性酶切分析被证实(未列数据)。一旦共转染至 COS 细胞，这些载体会允许 $\gamma 1/K$ 型的嵌合 BAT 抗体的瞬间表达。

10

此外，作为 BAT 抗体人源化项目的一种特殊成分，BAT V_H 基因还作为 $HindIII/BamHI$ 片段被亚克隆至 $pG3D110$ 和 $pG4D1100$ 重链表达载体中。除了以 γ 恒定区基因(在 $pG3D110$ 的情况下)的 cDNA 拷贝或 $\gamma 3$ 恒定区基因(在 $pG3D110$ 的情况下)的 cDNA 或 $\gamma 4$ 恒定区基因(在 $pG3D110$ 的情况下)的 cDNA 替换 $\gamma 1$ 人恒定区基因的 cDNA 拷贝外，这些载体与 $pG1D110$ 是一致的。这些载体的构建(即 $pG3D110-BATV_K$) 的目的是为了 $\gamma 3/K$ 和 $\gamma 4/K$ 型嵌合 BAT 抗体在 COS 细胞中表达。

15

20

实施例 5 嵌合 $\gamma 1/K$ BAT 抗体的瞬间表达

在一系列重复的瞬时表达实验中，载体 $pKN110-BATV_K$ 和 $pG1D110-BATV_H$ 被共转染至 COS 细胞。在表达 72 小时后，通过 $\gamma 1/K$ ELISA 在 COS 细胞共转染的上清液中检测到小鼠-人 $\gamma 1/K$ 嵌合 BAT 抗体。根据这些分析，在培养基中所检测到的 $\gamma 1/K$ 嵌合 BAT 抗体的平均浓度的计算值为 $509 \pm 272 \text{ ng/ml}$ 。

25

有趣的是， $\gamma 3/K$ 和 $\gamma 4/K$ 型嵌合 BAT 抗体在 COS 细胞中表达后，看来似乎产生更大量的抗体。特别是，当 $pG3D110-BATV_H$ 和 $pKN110-BATV_K$ 共转染至 COS 细胞，对上清液的初步分析(使用 4.3 节所描

30

述的 ELISA 方法并使用人 IgG3/ κ 抗体作为标准物) 测量出嵌合 γ 3/ κ BAT 抗体的表达水平是 6.7 μ g/ml。而且, 当 pG4D110-BATV_H 和 pKN110-BATV _{κ} 得以在 COS 细胞中表达时, 使用同样的 ELISA (使用人 IgG4/ κ 抗体作为标准物) 测量出嵌合 γ 4/ κ BAT 抗体的表达水平是 8.2 μ g/ml。

实施例 6 嵌合 γ 1/ κ BAT 抗体的纯化

在每次共转染中约收获 8ml, 实施一系列共转染直至收获 200ml COS 上清液。然后使这一上清液的体积通过一个具有 PM30 过滤膜(其截取分子量为 30kDa) 的微量搅拌超滤盒而浓缩至 15ml。

Immunopure® (G) IgG 纯化试剂盒的主要组成部分包括一个 2ml 的固定 G 蛋白柱。使用 6ml 洗脱缓冲液将抗体从柱上洗脱下来, 以 1ml 级分为单位收集洗脱物。然后使用 C3 节中所描述的 ELISA 方法分析每一级分中的嵌合 γ 1/ κ BAT 抗体的浓度。这一分析发现, 级分 3 (42.05 μ g/ml) 和级分 4 (20.05 μ g/ml) 中有嵌合抗体, 相当于共回收了 62.1 μ g 的嵌合 γ 1/ κ BAT 抗体。将其在 -20°C 下保存, 直至再转移至 Curetech 进行进一步分析。

实施例 7 对结合了嵌合 γ 1/ κ BAT 抗体的 Daudi 细胞的分析

使用 Daudi 细胞 ELISA, 清晰地表明纯化的嵌合 γ 1/ κ BAT 抗体与 Daudi 细胞结合。图 9 表示一个实验的典型例子。然而, 不太确定的是, 按照同样的 ELISA, 与类似浓度的小鼠 BAT 抗体的结合似乎比嵌合抗体更低。尽管如此, 由于用于检测与 Daudi 细胞结合的抗体的偶联型第二抗体对于每种抗体构建体是不同的, 不能合理地两种类型的结合进行直接对比。

表 4 用于对小鼠 BAT 抗体 κ 轻链和重链的可变区基因进行 PCR 修饰, 以使得其在哺乳动物细胞中表达为嵌合 $\gamma 1/\kappa$ BAT 抗体的一部分的引物

5

10

15

名称	序列 (5' → 3')
C0225 (42 聚体)	CCCAAGCTTGCCGCCACCATG GATTTTCAGGTGCAGATTATC
C0224 (39 聚体)	CGCGGATCCACTCACGTTTTA TTTCCAACCTTGTCCCCG
B8815 (40 聚体)	GGATCCACTCACCTGAGGAGA CGGTGACTGAGGTTTCCTTG
B8814 (42 聚体)	AAGCTTGCCGCCACCATGGCT TGGGTGTGGACCTTGCTATTC

表 5 用于 PCR 筛选已转化的集落以及 BAT 抗体经 PCR 修饰的可变区基因的 DNA 序列的引物

名称	序列 (5' → 3')
Huyl (17 聚体)	TTGGAGGAGGGTGCCAG
HCMVi.3s (28 聚体)	GTCACCGTCCTTGACACGCGT CTCGGGA
FOR (18 聚体)	TGTAAAACGACGGCCAGT
REV (18 聚体)	GAAACAGCTATGACCATG
B6990 (27 聚体)	CAGCATATGTTGACTCTCCAC TGTCGG
B6991 (27 聚体)	GTCAACATATGCTGAAGAGTT CAAGGG
B8809 (18 聚体)	TGCCAGGTCAAGTGTAAG
B8810 (18 聚体)	AAGCCAGGTTGGATGTCC

IV 取自与本发明的单克隆抗体结合的 Daudi B 细胞类淋巴母细胞系抗原的 3 个肽的氨基酸序列

测定包含在与本发明的单克隆抗体相结合的 Daudi B 类淋巴母细胞的抗原决定簇中的肽的序列。其序列分别在图 10、11 和 12 中描述。

当使用 TBLASTN 算式 (第二版), 期望值 (EXPECT Value) 为 10 以及 BLASUM62 矩阵, 将三条肽链作为查询对象时, 检索非冗

余基因数据库以及 EST Division, 没有发现吻合。

5 然而, 由于该肽链是小肽链, 还以更高的期望值以降低检索条件的严格度对它们重新进行了检索。筛选程序还被揭示出具有低复杂性, 其可从 blast 报告中消除潜在的混淆匹配 (例如, 针对富脯氨酸区或 proly-A 尾部的吻合), 而保留了其 blast 统计数据反映其成对对比的特异性的区域。即使在一个非常低严格度的标准下, 本发明的三条肽链仍然没有与基因库和 EST 片段发生任何吻合。

10 因此, 根据上述结果, 上述三条肽链应是新肽链。

IV 使用本发明的单克隆抗体诊断个体的恶性疾病

15 使用抗-CD3 抗体以及本发明的一种单克隆抗体对取自被检查个体的外周血淋巴细胞进行双重标记。确定与本发明的单克隆抗体结合的 CD3⁺细胞的百分比。根据本发明, 已经表明在患恶性疾病的个体中的 CD3⁺mAb⁺细胞数量与取自健康个体的血液样品中的这些细胞的百分比不同。与取自健康个体的 CD3⁺mAb⁺ 细胞百分比相比, 患恶性疾病的个体中的 CD3⁺ 细胞百分比有显著差异以及比其更高或更低的事实, 能够确定一个个体是否很可能患有恶性疾病, 同时也能够确定
20 被检查个体可能患有的特定种类的恶性疾病。

典型地, 使用 Ficoll Hypaque 密度离心法从取自健康个体或癌症患者的 20ml 血液中获得外周血淋巴细胞。洗涤细胞并在含有 0.5%BSA 和 0.05% as acid 的 PBS 中悬浮。使用含有 0.5×10^6 个细胞的样品进行
25 FACS 分析。首先, 细胞和饱和量的本发明的单克隆抗体在 0°C 下温育 45 分钟, 它们和与 FITC 偶联的抗小鼠单克隆抗体在冰上温育 30 分钟。洗涤两次, 在 1200rpm 下离心, 之后, 细胞和与 PE 抗体偶联的抗人 CD3 抗体在冰上温育 30 分钟。温育后, 洗涤细胞两次, 使用 FACS 扫描 (Bectan Dickinson) 分析样品。结果在图 13 至 17 中表示。

30

正如在图 13 及图 17 中所能看到的，取自健康个体血液样品的 CD3⁺BAT⁺ 细胞（与 CD3⁺ 细胞总量对比）的百分比在 25% 的范围内。如在图 14 所见，取自结肠癌病人的血液样品中的 CD3⁺BAT⁺ 细胞百分比与健康个体相比明显偏低，在大约 7% 的范围。类似地，取自乳腺癌病人的血液样品的 CD3⁺BAT⁺ 细胞的百分比在大约 10% 的范围（图 15）。这些结果清楚地表明，可以通过 CD3⁺BAT⁺ 细胞百分比与健康个体对比偏低的事实识别结肠癌和乳腺癌。

如在图 16 中所见，取自前列腺癌病人的血液样品的 CD3⁺BAT⁺ 细胞百分比在大约 50% 的范围内，明显高于取自健康个体血样中的百分比。这些事实清楚地表明，可以通过 CD3⁺BAT⁺ 细胞百分比与健康个体相比偏高的事实识别前列腺癌。如图 18 所见，在取自前列腺癌病人 T 细胞中所发现的与本发明的单克隆抗体相结合的抗原数量非常高，而在取自乳腺癌病人的 T 细胞中检测不到所述抗原。

上述结果表明本发明的单克隆抗体可以用于识别患有特定种类的恶性疾病的个体。因此，如果血液样品取自被检查个体并且本发明的单克隆抗体与样品中的 CD3⁺ 细胞的结合程度很高（在大约 50% 的范围），则被检查的个体极有可能患前列腺癌。与此相反，如果样品中 CD3⁺ 细胞的百分比与健康个体相比明显很低（在大约 7% 或 10% 的范围），则被检查个体很可能患乳腺癌或结肠癌。很明显地，如果被检查个体是男性，那么他很可能患结肠癌。

上述实施例不应被解释为限制，与本发明的单克隆抗体相结合的 CD3⁺ 细胞百分比和其他恶性疾病之间的其他关联也在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 莫尔研究应用有限公司 (MOR-RESEARCH APPLICATIONS LTD.)

<120> 单克隆抗体、抗原和恶性疾病的诊断和治疗 (MONOCLONAL ANTIBODIES, ANTIGENS AND DIAGNOSIS AND THERAPY OF MALIGNANT DISEASES.)

<130> SCT011318-09

<140> PCT/IL99/00518

<141> 1999-09-30

<150> IL129299

<151> 1999-03-31

<160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 462

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 1

```
tactagtcga catggcttgg gtgtggacct tgctattcct gatggcagct gcccaaagta 60
tccaagcaca gatccagttg gtgcagtctg gacctgagtt gaagaagcct ggagagacag 120
tcaagatctc ctgcaaggct tctggatata ctttcacaaa ctatggaatg aactgggtga 180
agcaggctcc aggaaagggt ttaaagtgga tgggctggat aaacaccgac agtggagagt 240
caacatatgc tgaagagttc aagggacggt ttgccttctc tttggaaacc tctgccaaca 300
ctgcctatth gcagatcaac aacctcaaca atgaggacac gcctacatat ttctgtgtga 360
gagtcggcta cgatgctttg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc gtctcctcaa 420
ctacaacaac agcccatct gtctatccct tcccggttc ca 462
```

<210> 2

<211> 443

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 2

```
actagtcgac atggatttac aggtgcagat tadcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt 60
cataatgtcc agaggacaaa ttgttctcac ccagctctcca gcaatcatgt ctgcatctcc 120
aggggagaag gtcaccataa cctgcagtgc caggtaaggt gtaagttaca tgcactggtt 180
ccagcagaag ccaggcactt ctcccaaact ctggatttat aggacatcca acctggcttc 240
tggagtcctt gctcgttca gtggcagtgg atctgggacc tcttactgtc tcacaatcag 300
ccgaatggag gctgaagatg ctgccactta ttactgccag caaaggagta gtttcccact 360
cacgttcggc tcggggacaa agttggaaat aaaacgggct gatgctgcac caactgtatc 420
catcttccca ccatccaaga tct                                     443
```

<210> 3

<211> 412

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 3

```
aagcttgccg ccaccatgga ttacaggtg cagattatca gcttctgct aatcagtgcc 60
tcagtcataa tgtccagagg acaaattggt ctcaccaggt ctccagcaat catgtctgca 120
tctccagggg agaaggtcac cataacctgc agtgccaggt caagtgtaag ttacatgcac 180
tggttccagc agaagccagg cacttctccc aaactctgga ttataggac atccaacctg 240
gcttctggag tccctgctcg cttcagtggc agtggatctg ggaccttta ctgtctcaca 300
atcagccgaa tggaggtgga agatgctgcc acttattact gccagcaaag gagtagtttc 360
ccactcacgt tcggctcggg gacaaagttg gaaataaac gtgagtggat cc          412
```

<210> 4

<211> 436

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<400> 4

```
aagcttgccg ccaccatggc ttgggtgtgg accttgctat tctgatggc agctgcccac 60
agtatccaag cacagatcca gttggtgcag tctggacctg agttgaagaa gcctggagag 120
acagtcaaga tctctgcaa ggcttctgga tatacttca caaactatgg aatgaactgg 180
gtgaagcagg ctccagaaa gggtttaaag tggatgggct ggataaacac cgacagtgga 240
gagtaacat atgctgaaga gttcaaggga cggtttgctt tctctttgga aacctctgcc 300
aacactgcct atttgcagat caacaacctc aacaatgagg acacggctac atatttctgt 360
```

gtgagagtcg gctacgatgc ttggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 420
tcaggtgagt ggatcc 436

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人类

<400> 5
caagggatag acagatgggg c 21

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> 人类

<400> 6
atggactcca ggctcaattt agttttcctt 30

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> 人类

<400> 7
atggmttggg tgtggamctt gctattcctg 30

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人类

<400> 8
actggatggt gggaagatgg 20

<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> 人类

<400> 9	
atggaagccc cagctcagct tctcttcc	28
<210> 10	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人类	
<400> 10	
atggagwcag acacactcct gytatgggtg	30
<210> 11	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人类	
<400> 11	
atggatttwc aggtgcagat twtcagcttc	30
<210> 12	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人类	
<400> 12	
atgaggtkcy ytgytsagyt yctgrgg	27
<210> 13	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人类	
<400> 13	
ctagatgcat gctcgagc	18
<210> 14	
<211> 21	
<212> DNA	

<213> 人类

<400> 14

taccgagctc ggatccacta g 21

<210> 15

<211> 42

<212> DNA

<213> 人类

<400> 15

aagcttgccg ccaccatggc ttgggtgtgg accttgctat tc 42

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> 人类

<400> 16

ggatccactc acctgaggag acggtgactg aggttccttg 40

<210> 17

<211> 39

<212> DNA

<213> 人类

<400> 17

cgcggatcca ctcacgtttt attccaact ttgtccccg 39

<210> 18

<211> 42

<212> DNA

<213> 人类

<400> 18

cccaagcttg ccgccacat ggattttcag gtgcagatta tc 42

<210> 19

<211> 27

<212> DNA
<213> 人类

<400> 19
cagcatatgt tgactctcca ctgtcgg 27

<210> 20
<211> 27
<212> DNA
<213> 人类

<400> 20
gtcaacatat gctgaagagt tcaaggg 27

<210> 21
<211> 18
<212> DNA
<213> 人类

<400> 21
tgccagggtca agtgtaag 18

<210> 22
<211> 18
<212> DNA
<213> 人类

<400> 22
aagccagggtt ggatgtcc 18

<210> 23
<211> 18
<212> DNA
<213> 人类

<400> 23
tgtaaaacga cggccagt 18

<210> 24

<211> 28

<212> DNA

<213> 人类

<400> 24

gtcaccgtcc ttgacacgcg tctcggga

28

<210> 25

<211> 17

<212> DNA

<213> 人类

<400> 25

ttggaggagg gtgccag

17

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> 人类

<400> 26

gaaacagcta tgaccatg

18

1

1



1

TACTAGTCGACATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTATTCCCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTATCCAAGCACA
 ATGATCAGCTGTACCGAACCCACACCTGGAACGATAAGGACTACCGTCGACGGGTTTCATAGGTTTCGTGT
 M A W V W T L L F L M A A Q S I Q A Q

GATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGTTGAAGAAGCCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCT
 CTAGGTC AACACGTCAGACCTGGACTCAACTTCTTCGGACCTCTCTGTCTCAGTCTAGAGGACGTTCCCGA
 I Q L V Q S G P E L K K P G E T V K I S C K A

TCTGGATATACTTTCACAAACTATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAGGGTTTAAAGTGG
 AGACCTATATGAAAGTGTGATACCTTACTTGACCCACTTCGTCGGAGGTCCTTCCCAAATTCACCT
 S G Y T F T N Y G M N W V K Q A P G K G L K W

TGGCTGGATAAACACCGACAGTGGAGTCAACATATGCTGAAGAGTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTC
 ACCGACCTATTTGTGGCTGTACCTCTCAGTTGTATACGACTTCTCAAGTTCCCTGCCAAACGGAAAG
 M G W I N T D S G E S T Y A E E F K G R F A F S

TTTGGAAACCTCTGCCAACACTGCCCTATTGTCAGATCAACAACCTCAACAATGAGGACACGCCCTACATAT
 AAACCTTTGGAGACGGTTGTGACGGATAAACGCTAGTTGTTGGAGTTGTACTCTCTGTGCGGATGTATA
 L E T S A N T A Y L Q I N N L N E D T A T Y

TTCTGTGTGAGAGTCGGCTACGATGCTTTGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCAACCGTCTCCTCAA
 AAGACACTCTCAGCCGATGCTACGAAACCTGATGACCCCAAGTTCCCTGGAGTCAGTGGCAGAGGAGTT
 F C V R V G Y D A L D Y W G Q G T S V T V S S

CTACAACACAGCCCCATCTGTCTATCCCTTCCCGGGTTCCA
 GATGTTGTTGTCGGGGTAGACAGATAGGGAAGGGCCCCAAGGT

图 2

ACTAGTCGACATGGATTTACAGGTGCAGATTATCAGCTTCCCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAAATGTC
 TGATCAGCTGTACCTAAATGTCCACGCTAATAGTCGAAGACGATTAGTCACGGAGTCAGTATTACAGG
 M D L Q V Q I I S F L L I S A S V I M S
 AGAGGACAAATTGTTCTCACCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATAA
 TCTCCTGTTTAAACAAGAGTGGTCCAGAGGTCGTTAGTACAGACGTAGAGGTCCCTTCCAGTGGTATT
 R G Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I
 CCTGCAGTGCCAGGTCAAGTGTAAAGTTACATGCACCTGGTTCAGCAGAAAGCCAGGCACTTCTCCAAACT
 GGACGTCACGGTCCAGTTCACATTCAAATGTACGTGACCAAGTCTCGTCTCCGTCCGTGAAGAGGGTTGA
 T C S A R S S V S Y M H W F Q Q K P G T S P K L
 CTGGATTATAGGACATCCAACCCTGGTTCGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACC
 GACCTAAATATCCTGTAGTGGACCCGAAGACCTCAGGGACGAGCGAAGTCACCCGTACCCTAGACCCCTGG
 W I Y R T S N L A S G V P A R F S G S G S G T
 TCTTACTGTCTACAATCAGCCGAATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGAGTA
 AGAATGACAGAGTGTAGTCGGCTTACCTCCGACTTCTACGACGGTGAATAATGACGGTCTGTTCCCTCAT
 S Y C L T I S R M E A E D A A T Y Y C Q Q R S
 GTTCCCACTCACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGAAAATAAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATC
 CAAGGGTGAGTGCAAGCCGAGCCCTGTTTCAACCTTTATTGCCCCGACTACGACCGTGGTTGACATAG
 S F P L T F G S G T K L E I K
 CATCTTCCCACTCAAGATCT
 GTAGAAGGTTGGTAGGTTCTAGA

图 3

```

BAT:      QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMN-WVKQAPGKGLKWMG
VMS2:      .....

BAT:      WINT-DSGESTYAEEFKGRFAFSLETSANTAYLQINNLLNEDTATYFCVR
VMS2A:     .....NT..P.....S.....K.....A.

BAT:      VGYDA-----LDYWGQGTSVTVSS
VMS2:      R..YYGSR.....YGAM.....
    
```

残基 H 53 (Kabat)

BAT: Asp(D) 种系 : Asn(N)

小鼠 V_H Misc.

所有小鼠: V_H

残基	% 出现频率	残基	% 出现频率
Ile	43.33	Gly	27.60
Pro	25.00	Asn	25.98
Thr	20.00	Tyr	13.72
Leu	6.67	Ser	11.02
Ser	1.67	Ala	7.33
His	1.67	<u>Asp</u>	<u>4.93</u>
Val	1.67	Trp	2.06
		Arg	1.84
		His	1.63
		Glu	1.50
		Thr	0.73
		Phe	0.47
		Lys	0.43
		Val	0.26
		Leu	0.17
		Pro	0.13
		Ile	0.09
		Gin	0.09
		Cys	0.04

图 3 续

残基 H 54 (Kabat)
BAT: Ser(S) 种系: Thr(T)

小鼠 残基	V_H Misc. % 出现频率	所有小鼠 残基	V_H % 出现频率
Tyr	30.51	Asn	28.79
Asn	25.42	<u>Ser</u>	<u>26.18</u>
Thr	23.73	Gly	22.72
His	5.08	Asp	13.70
<u>Ser</u>	<u>5.08</u>	Thr	3.94
Lys	3.39	Lys	1.63
Asp	3.39	Tyr	1.34
Leu	1.69	Ile	0.38
Ala	1.69	Arg	0.29
		Ala	0.25
		His	0.25
		Pro	0.17
		Phe	0.13
		Trp	0.08
		Cys	0.08
		Val	0.04
		Leu	0.04

残基 H 57 (Kabat)

BAT: Ser(S) 种系: Pro(P)

小鼠 残基	V_H Misc. % 出现频率	所有小鼠 残基	V_H % 出现频率
Pro	100.00	Thr	77.80
		Ile	11.89
		Pro	2.49
		<u>Ser</u>	<u>2.11</u>
		Lys	1.91
		Asn	1.62
		Ala	0.87
		Leu	0.41
		Val	0.17
		His	0.17
		Arg	0.12
		Gln	0.08
		Met	0.08
		Phe	0.08
		Gly	0.08
		Tyr	0.04
		Cys	0.04
		Asp	0.04

图 3 续(2)

残基 H 76 (Kabat)

BAT: Asn(N) 种系 : Ser(S)

小鼠 V _H Misc.		所有小鼠 V _H	
残基	% 出现频率	残基	% 出现频率
Ser	58.33	Ser	66.26
<u>Asn</u>	<u>38.33</u>	<u>Asn</u>	<u>29.73</u>
Ile	1.67	Thr	1.42
Tyr	1.67	Arg	0.90
		Lys	0.34
		Asp	0.34
		Gly	0.26
		Ile	0.22
		Tyr	0.17
		Ala	0.13
		Gln	0.09
		His	0.09
		Glu	0.04

残基 H 83 (Kabat)

BAT: Asn(N) 种系 : Lys(K)

小鼠 V _H Misc.		所有小鼠 V _H	
残基	% 出现频率	残基	% 出现频率
Arg	51.67	Thr	60.98
Lys	35.00	Arg	18.32
Thr	8.33	Lys	8.69
Gln	1.67	Gln	8.69
Ser	1.67	Asp	1.77
<u>Asn</u>	<u>1.67</u>	Ala	0.91
		Ser	0.35
		<u>Asn</u>	<u>0.13</u>
		Ile	0.09
		His	0.04
		Glu	0.04

图 3 续(3)

残基 H 93 (Kabat), Vernier 残基

BAT: Val(V) 种系: Ala(A)

小鼠 V_HMisc.

残基	% 出现频率
Ala	62.71
Met	25.42
Thr	3.39
Val	<u>3.39</u>
Lys	1.69
Leu	1.69
Asn	1.69

所有小鼠 V_H

残基	% 出现频率
Ala	83.26
Thr	8.03
Val	<u>3.74</u>
Ser	1.36
Gly	1.27
Met	0.89
Asn	0.34
Pro	0.26
Lys	0.21
Trp	0.17
Asp	0.13
Ile	0.13
Leu	0.08
Tyr	0.04
Phe	0.04
His	0.04

残基 H 95 (Kabat)

BAT: Val(V) 种系: Arg(R)

小鼠 V_HMisc.

残基	% 出现频率
Tyr	25.42
Asp	13.56
Trp	11.86
Ser	10.17
Arg	10.17
Gly	6.78
Pro	5.08
Gln	5.08
His	5.08
Lys	3.39
Cys	1.69
Phe	1.69

所有小鼠 V_H

残基	% 出现频率
Ser	16.24
Tyr	15.18
Gly	13.81
Asp	13.28
Arg	9.00
Glu	4.41
Asn	4.37
Leu	3.53
Pro	2.96
His	2.47
Ala	2.43
Trp	2.38
Thr	1.94
Lys	1.68
Gln	1.50
Val	<u>1.15</u>
Ile	1.15
Phe	1.10
Cys	1.06
Met	0.35

图 3 续(4)

残基 H 98 (Kabat)

BAT: Asp(D) 种系: Tyr(Y)小鼠 V_HMisc.所有小鼠 V_H

残基	% 出现频率	残基	% 出现频率
Tyr	56.00	Tyr	32.11
Gly	10.00	Gly	24.52
Thr	6.00	<u>Asp</u>	<u>6.79</u>
Ala	6.00	Ser	6.16
Asn	4.00	Arg	4.51
Ser	4.00	Asn	4.41
<u>Asp</u>	<u>4.00</u>	Thr	3.61
Leu	2.00	Leu	3.61
Arg	2.00	Ala	2.18
Pro	2.00	Phe	2.07
Ile	2.00	Val	1.70
Lys	2.00	Trp	1.65
		Pro	1.59
		Ile	1.22
		Lys	1.06
		His	1.01
		Glu	0.80
		Gln	0.69
		Met	0.21

图 3 续(5)

残基 H 99 (Kabat)

BAT: Ala(A) 种系 : Tyr(Y)

小鼠 残基	V _H Misc. % 出现频率	所有小鼠 残基	V _H % 出现频率
Trp	28.26	Gly	27.95
Gly	15.22	Tyr	16.87
Ser	15.22	Ser	16.76
Tyr	13.04	Arg	6.63
Pro	6.52	Asp	4.20
Met	4.35	Asn	4.03
Arg	4.35	Thr	3.73
Asn	4.35	<u>Ala</u>	<u>3.20</u>
Asp	2.17	<u>Leu</u>	<u>3.02</u>
Phe	2.17	Pro	2.78
His	2.17	Phe	2.61
<u>Ala</u>	<u>2.17</u>	Val	2.25
		Glu	1.24
		His	0.89
		Lys	0.89
		Gln	0.83
		Ile	0.83
		Met	0.53
		Trp	0.53
		Cys	0.18
		其他	0.06

残基 H100K (Kabat)

BAT: Leu(L) 种系 : Met(M)

小鼠 残基	V _H Misc. % 出现频率	所有小鼠 残基	V _H % 出现频率
Gln	61.54	Phe	70.91
Thr	25.00	Met	24.40
Ala	13.46	<u>Leu</u>	<u>2.46</u>
		Ile	0.59
		Val	0.53
		Ser	0.41
		Tyr	0.35
		Thr	0.18
		Ala	0.06
		His	0.06
		Gly	0.06

图 4

BAT: QIVLTQSPA~~IMS~~ASPGEKVTITCSARS-----SVSYMHWFQKPGTSPKLWIY
 H4:S...S.....Y.Y.....S...P...

BAT: RTSN~~LAG~~VPARFSGSGSGTSYCLTISRMEAEDAATYYCQQRSSFP-----PLT
 H4:S...S.....YH.Y.....-F.

BAT: FGS~~G~~TKLEI-K
 H4:

残基 L 22 (Kabat)

BAT: Thr (T) 种系: Ser (S)

小鼠 V _x Misc.		所有小鼠 V _x	
残基	% 出现频率	残基	% 出现频率
<u>Thr</u>	<u>98.09</u>	Ser	50.26
Ser	1.27	<u>Thr</u>	<u>46.44</u>
Ile	0.64	Asn	1.16
		Arg	0.71
		Phe	0.32
		Pro	0.26
		Ala	0.26
		Tyr	0.19
		Ile	0.19
		Cys	0.13
		其他	0.06

图 4 续

残基 L 26 (Kabat)

BAT: Arg(R) 种系: Ser(S)

小鼠 V _x VI		所有小鼠 V _x	
残基	% 出现频率	残基	% 出现频率
Ser	96.79	Ser	96.09
<u>Arg</u>	<u>1.92</u>	Asn	1.41
Ile	0.64	<u>Thr</u>	<u>1.28</u>
Thr	0.64	<u>Arg</u>	<u>0.64</u>
		Ile	0.32
		Cys	0.06
		Met	0.06
		Leu	0.06
		Gly	0.06

残基 L 34 (Kabat)

BAT: His(H) 种系: Tyr(Y)

小鼠 V _x VI		所有小鼠 V _x	
残基	% 出现频率	残基	% 出现频率
Tyr	85.62	<u>His</u>	<u>35.78</u>
Phe	13.73	Asn	20.49
<u>His</u>	<u>0.65</u>	Ala	18.73
		Tyr	7.89
		Glu	6.14
		Ser	5.20
		Gln	2.00
		Thr	1.57
		Val	0.38
		Phe	0.38
		Asp	0.38
		Gly	0.38
		Ile	0.25
		Cys	0.13
		Arg	0.13
		Trp	0.06
		Leu	0.06
		Lys	0.06

图 4 续(2)

残基 L 36 (Kabat), Vernier 残基

BAT: Phe(F) 种系: Tyr(Y)

小鼠 V _x VI		所有小鼠 V _x	
残基	% 出现频率	残基	% 出现频率
Gln	98.76	Tyr	82.43
His	1.24	<u>Phe</u>	<u>11.13</u>
		Leu	4.44
		His	0.88
		Asn	0.38
		Ser	0.19
		Cys	0.13
		Val	0.13
		Asp	0.06
		Ala	0.06
		Trp	0.06
		Ile	0.06
		其他	0.06

残基 L 42 (Kabat)

BAT: Thr(T) 种系: Ser(S)

小鼠 V _x VI		所有小鼠 V _x	
残基	% 出现频率	残基	% 出现频率
Pro	100.00	Gln	44.92
		<u>Thr</u>	<u>18.73</u>
		Lys	10.28
		Gly	9.90
		Ser	7.83
		Glu	2.44
		Ala	1.88
		Phe	1.75
		Asn	1.13
		Arg	0.63
		His	0.19
		Trp	0.06
		Val	0.06
		Pro	0.06
		Ile	0.06
		其他	0.06

图 4 续(3)

Val	1.27	Arg	19.36
		Pro	4.53
		Thr	2.94
		Ala	1.23
		Val	0.92
		Ile	0.55
		Phe	0.43
		Gly	0.37
		Ser	0.25
		His	0.12
		Gln	0.06
		Asp	0.06
		Met	0.06
		Lys	0.06

残基 L 72 (Kabat)

BAT: Cys (C) 种系: Ser(S)

小鼠 V _x VI		所有小鼠 V _x	
残基	% 出现频率	残基	% 出现频率
Ser	96.89	Ser	50.52
Thr	3.11	Thr	47.44
		Val	0.56
		Ala	0.37
		Pro	0.31
		Ile	0.31
		Phe	0.19
		Arg	0.12
		Tyr	0.12
		Lys	0.06

图 4 续(4)

残基 L 77 (Kabat)

BAT: Arg(R) 种系: Ser(S)

小鼠 V _{XVI}		所有小鼠 V _X	
残基	% 出现频率	残基	% 出现频率
Ser	83.33	Ser	48.12
<u>Arg</u>	<u>10.36</u>	<u>Arg</u>	<u>23.28</u>
Thr	3.85	Asn	13.14
Pro	1.28	Pro	10.51
Ile	1.28	Thr	3.69
		Gly	0.50
		Cys	0.19
		Ala	0.13
		Asp	0.13
		Ile	0.13
		Val	0.06
		Tyr	0.06
		Glu	0.06

残基 L 91 (Kabat)

BAT: Arg(R) 种系: Tyr(Y)

小鼠 V _{XVI}		所有小鼠 V _X	
残基	% 出现频率	残基	% 出现频率
Trp	80.63	Trp	20.41
<u>Arg</u>	<u>8.75</u>	Gly	19.33
Gly	6.25	Ser	18.76
Phe	1.88	Tyr	15.40
Tyr	1.25	His	8.49
Asp	0.62	Asp	4.37
Ser	0.62	Phe	3.36
		<u>Arg</u>	<u>2.47</u>
		Asn	1.90
		Leu	1.52
		Thr	0.82
		Val	0.76
		Cys	0.76
		Ala	0.63
		Ile	0.44
		Gln	0.25
		Met	0.19
		其他	0.13

图 4 续(5)

残基 L 92 (Kabat)

BAT: Ser(S)

种系: His(H)

小鼠 V_{xVI}

残基	% 出现频率
<u>Ser</u>	74.52
Asn	12.10
Thr	8.92
Arg	1.27
Tyr	1.27
Gly	0.64
His	0.64
Asp	0.64

所有小鼠 V_x

残基	% 出现频率
<u>Ser</u>	33.10
Asn	14.19
Thr	12.72
Tyr	12.46
His	5.24
Asp	4.28
Leu	4.22
Arg	3.26
Trp	2.81
Lys	1.79
Ala	1.66
Gly	1.28
Val	1.09
Gln	0.83
Ile	0.58
Cys	0.26
Phe	0.19
Met	0.06

残基 L 94 (Kabat)

BAT: Phe(F)

种系: Tyr(Y)

小鼠 V_{xVI}

残基	% 出现频率
Asn	66.67
Tyr	15.72
Pro	11.32
Ser	3.77
Ile	0.63
Leu	0.63
Lys	0.63
His	0.63

所有小鼠 V_x

残基	% 出现频率
Tyr	19.54
Asn	16.83
Val	14.89
Leu	13.35
Ser	6.90
<u>Phe</u>	6.45
Thr	6.25
Asp	4.96
Ile	4.00
Trp	2.39
Ala	0.97
Pro	0.84
His	0.58
Gln	0.52
Met	0.45
Lys	0.39
Gly	0.19
Cys	0.19
Arg	0.19
Glu	0.13

图 4 续(6)

残基 L 95F (Kabat)

BAT: Pro(P) 种系 : *Gap(-)*

小鼠 V _x VI		所有小鼠 V _x	
残基	% 出现频率	残基	% 出现频率
Arg	100.00	Thr	98.30
		<u>Pro</u>	<u>0.35</u>
		Ser	0.28
		Met	0.21
		Val	0.21
		Phe	0.21
		Leu	0.14
		Ala	0.07
		Arg	0.07
		Lys	0.07
		其他	0.07

残基 L 96 (Kabat)

BAT: Leu(L) 种系 : *Phe(F)*

小鼠 V _x VI		所有小鼠 V _x	
残基	% 出现频率	残基	% 出现频率
<u>Leu</u>	<u>57.14</u>	<i>Phe</i>	99.37
Ile	17.01	<u>Leu</u>	<u>0.28</u>
Tyr	7.48	Gly	0.21
Trp	6.80	Arg	0.07
Phe	5.44	Val	0.07
Pro	2.72		
Arg	2.04		
His	0.68		
Val	0.68		

图 5

AAGCTTGCCGCCACCATGGATTACAGGTGCAGATTATCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCC
 TTCGAAACGGCGGTACCTAAATGTCCACGTTAATAGTCGAAGGACGATTAGTCACGG
 M D L Q V Q I I S F L L I S A
 TCAGTCATAATGCCAGAGGACAAATGTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGCTCTGCA
 AGTCAGTATTACAGGTCCTCCTGTTTAAACAAGAGTGGTCAGAGGTCGTTAGTACAGACGT
 S V I M S R G Q I V L T Q S P A I M S A
 TCCTCAGGGAGAAGGTCACCATAACCTGCAGTCCAGGTCAGTGAAGTTACATGCAC
 AGAGGTCCTCCTCCAGTGGTATTGGACGTCACGGTCCAGTTCACATTCAAATGTACGGT
 S P G E K V T I T C S A R S S V S Y M H
 TGGTTCAGCAGAAGCCAGGCCACTTCTCCAAACTCTGGATTTATAGGACATCCAACCTG
 ACCAAGTCGCTTCGGTCCGTGAAGAGGTTTGAGACCCTAAATATCCTGTAGTTGGAC
 W F Q Q K P G T S P K L W I Y R T S N L
 GCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTTACTGTCTCACA
 CGAAGACCTCAGGGACGAGCGAAGTCACCGTCACCTAGACCCCTGGAGAATGACAGAGTGT
 A S G V P A R F S G S G T S Y C L T
 ATCAGCCGATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGAGTAGTTTC
 TAGTCGGCTTACCTCCGACTTCTACGACGGTGAATAATGACGGTCTTCTCCTCATCAAAG
 I S R M E A E D A A T Y Y C Q Q R S S F
 CCACTCACGTTCCGGCTCGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGTGAGTGGATCC
 GGTGAGTGCAAGCCGAGCCCCCTGTTTCAACCTTTATTTTGCACCTCACCCCTAGG
 P L T F G S G T K L E I K

图 6

AAGCTTGCCGCCACCATGGCTTGGGTGGACCTTGCTATTCCTGATGGCAGCTGCCCAA
 TTCGAACGGCGGTGGTACCGAACCCACACCTTGAACCGATAGGACTACCGTCGACGGGTT
 M A W V W T L L F L M A A Q
 AGTATCCAAGCACAGATCCAGTTGGTGCAGCTGGACCTGAGTTGAAGAAGCCTGGAGAG
 TCATAGGTTTCGTCTAGGTC AACCCAGCTCAGACCTGGACTCAACTTCTTCGGACCTCTC
 S I Q A Q I Q L V Q S G P E L K K P G E
 ACAGTCAAGATCCTCGAAGGCTTCGGATATACTTTCACAAACTATGGAATGAACITGG
 TGTCAAGTTCTAGAGGACGTTCCGAAGACCTATATGAAAGTGTGATACCTTACTTGACC
 T V E I S C K A S G Y T F T N Y G M N W
 GTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACCACCCAGTGGGA
 CACTTCGTCCGAGGCTCTCCCAAATTCACCTACCCGACCTATTTGTGGCTGTCACTT
 V K Q A P G K G L K W M G W I N T D S G
 GAGTCAACATATGCTGAAGAGTTCAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCC
 CTCAGTTGTATACGACTTCTCAAGTTCCTGCCAAACGGGAAGAGAAACCTTTGGAGACGG
 E S T Y A E E F K G R F A F S L E T S A
 AACACTGCCCTATTGCAGATCAACACCCTCAACAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGT
 TTGTGACGGGATAAACGCTTAGTTGTTGGAGTTGTACTCTCTGTGCCGATGTATAAAGACA
 N T A Y L Q I N N L N N E D T A T Y F C
 GTGAGAGTCGGCTACGATGCTTTGGACTACTGGGTCAGGAACTCAGTCACCCGCTCTCC
 CACTCTCAGCCGATGCTACGAAACCTGATGACCCAGTTCCTTGGAGTCAGTGGCAGAGG
 V R V G Y D A L D Y W G Q G T S V T V S
 TCAGGTGAGTGGATCC
 AGTCCACTCACCTAGG

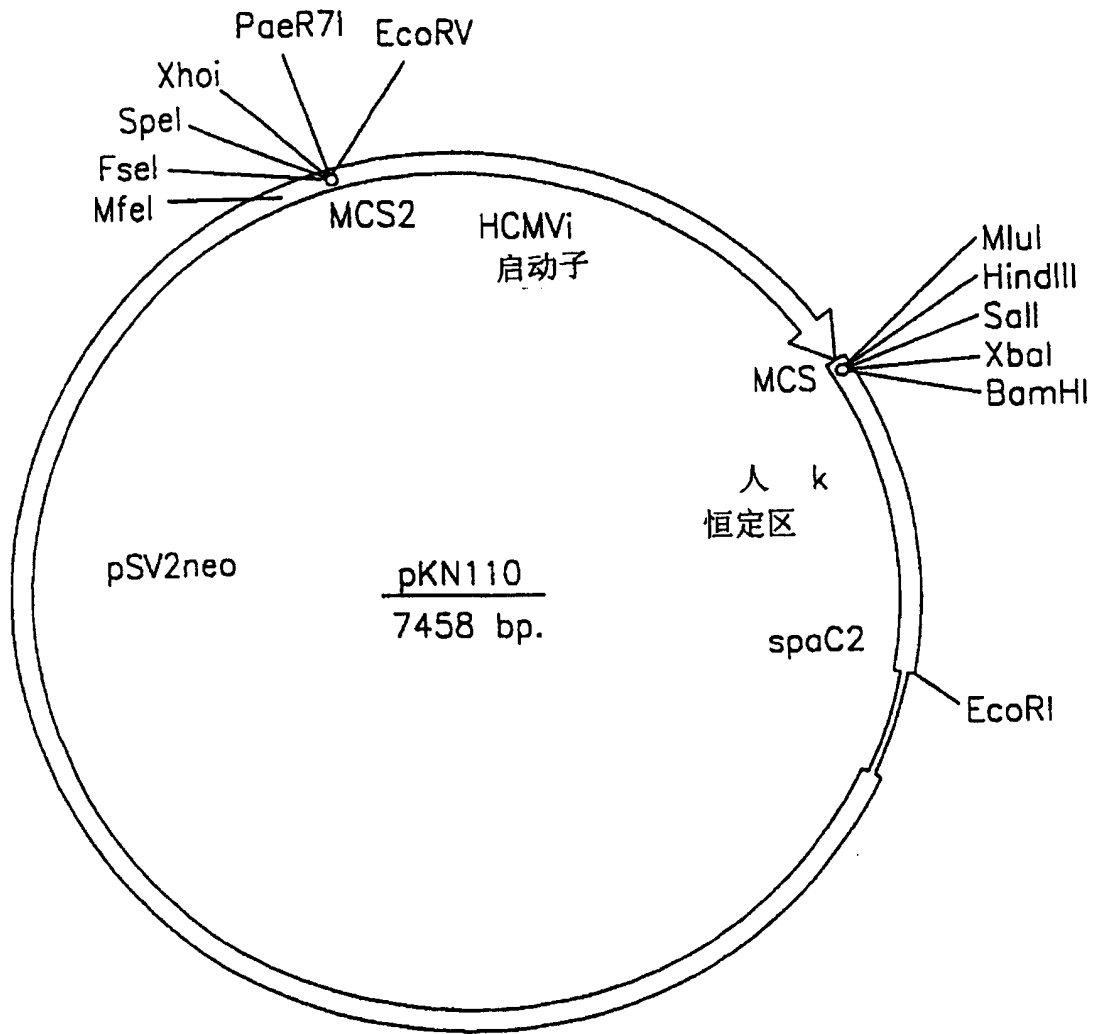


图 7

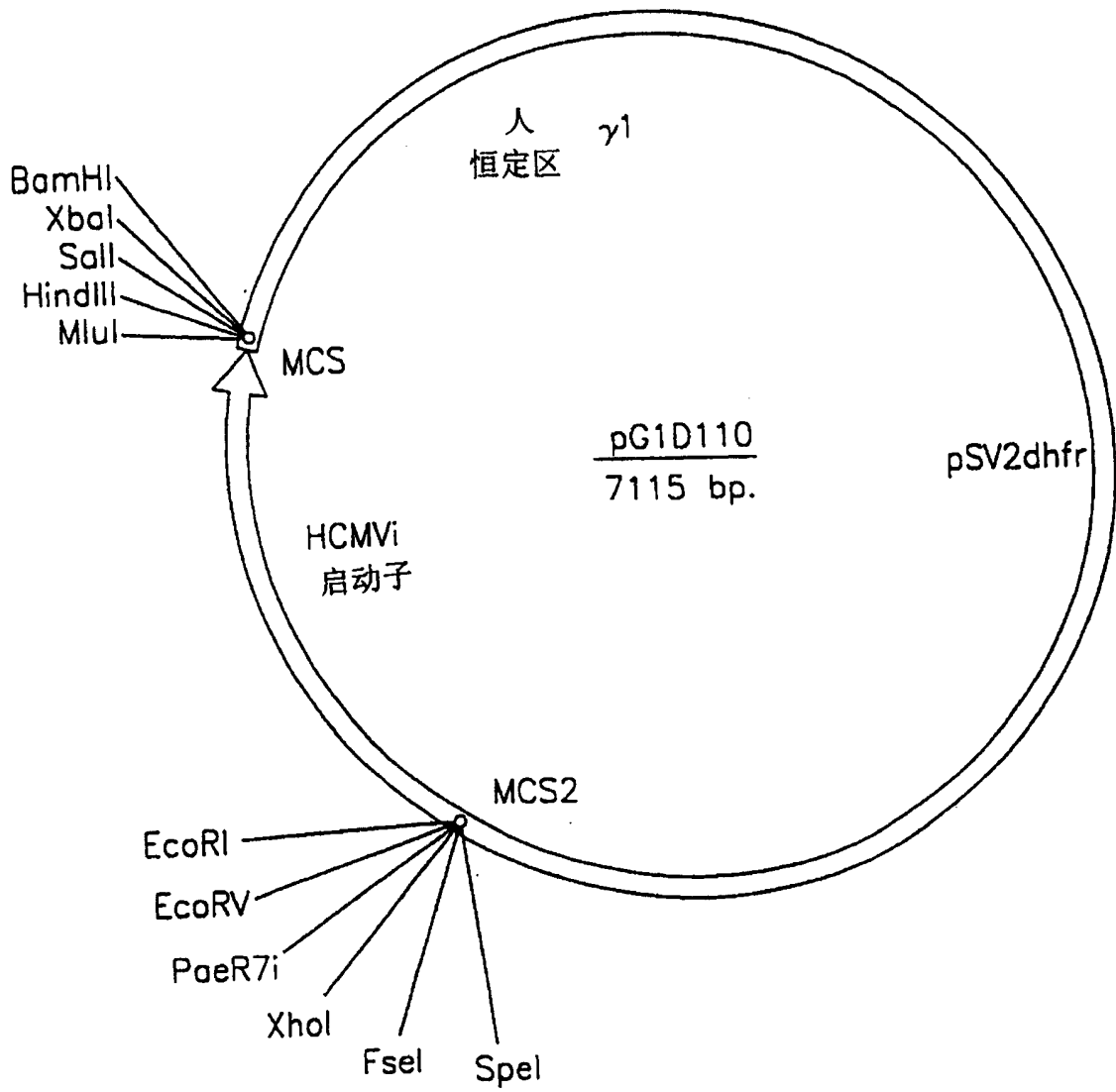


图 8

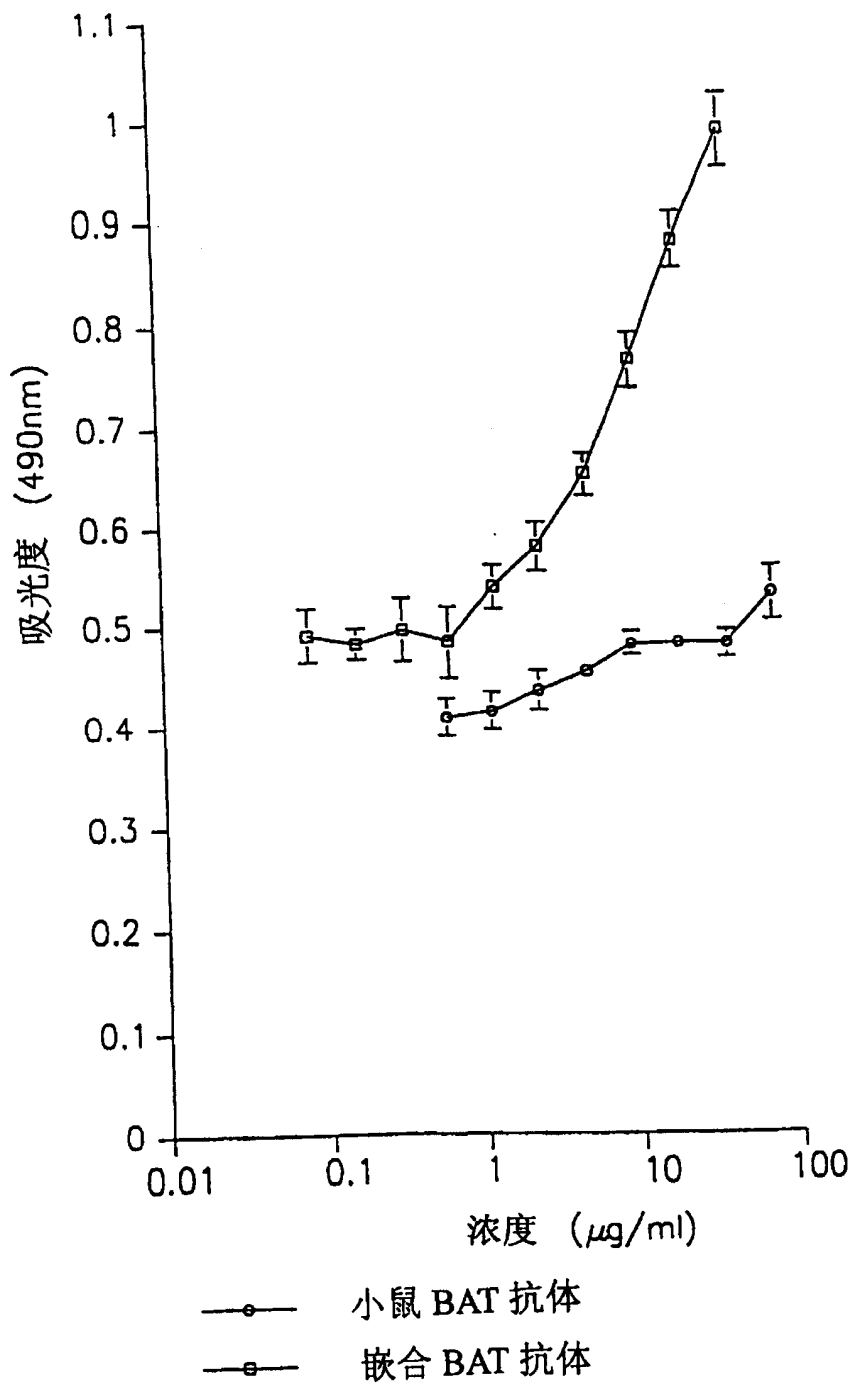


图 9

肽 1: TINEEEKC:

图 10

肽 1: NSGPSMRKKNVSIG

图 11

肽 1: IPDHQ

图 12

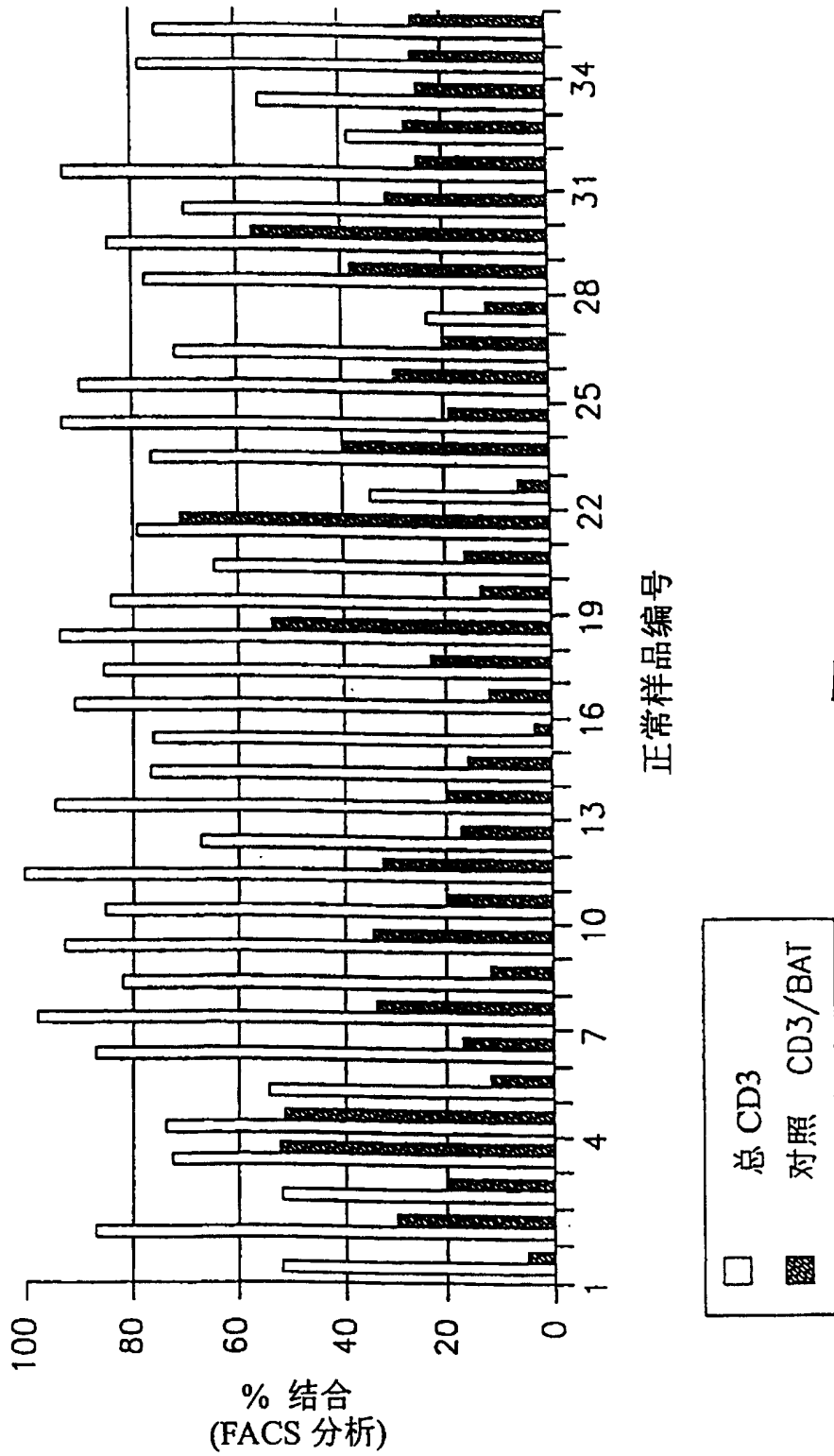
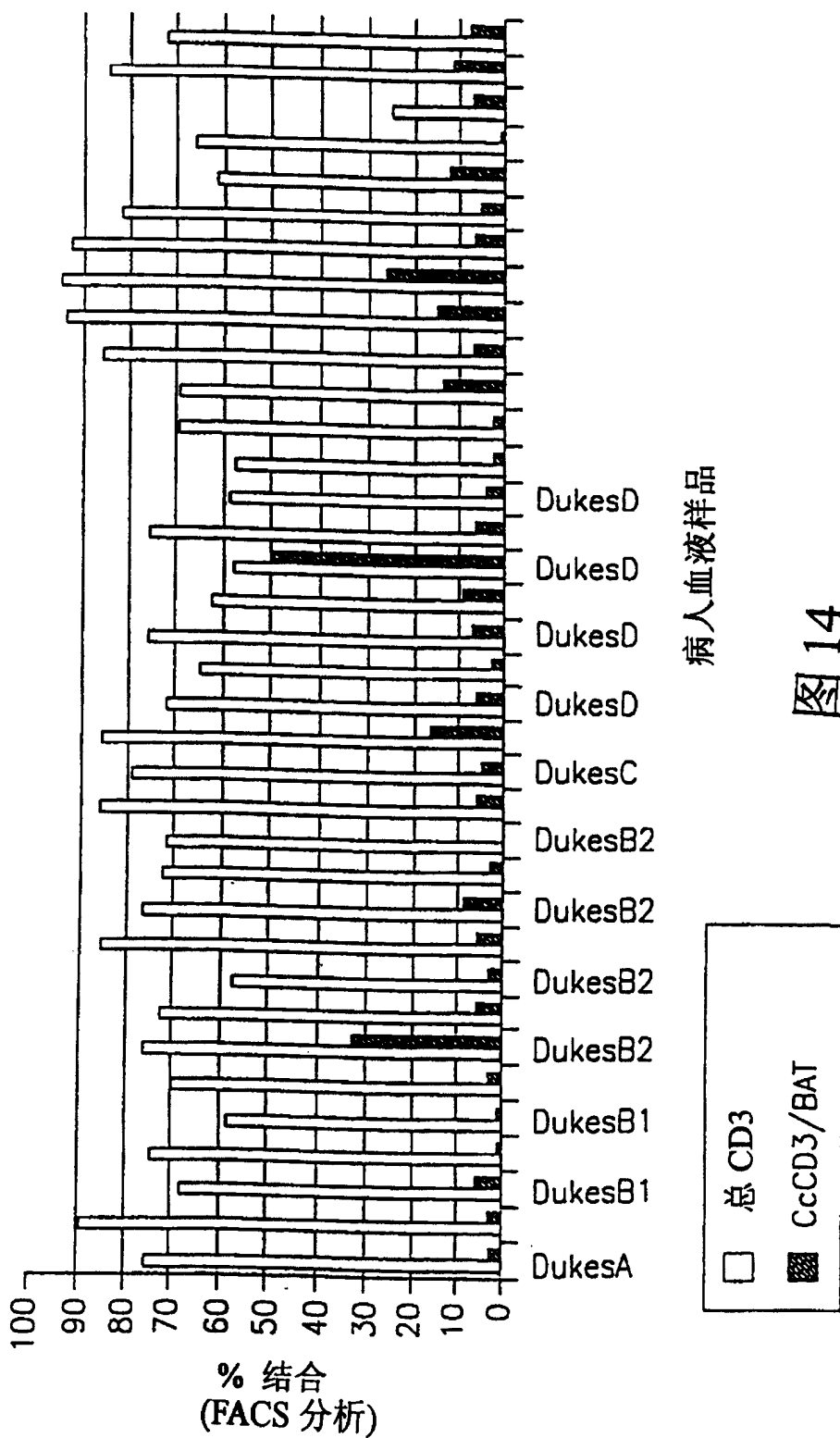


图 13



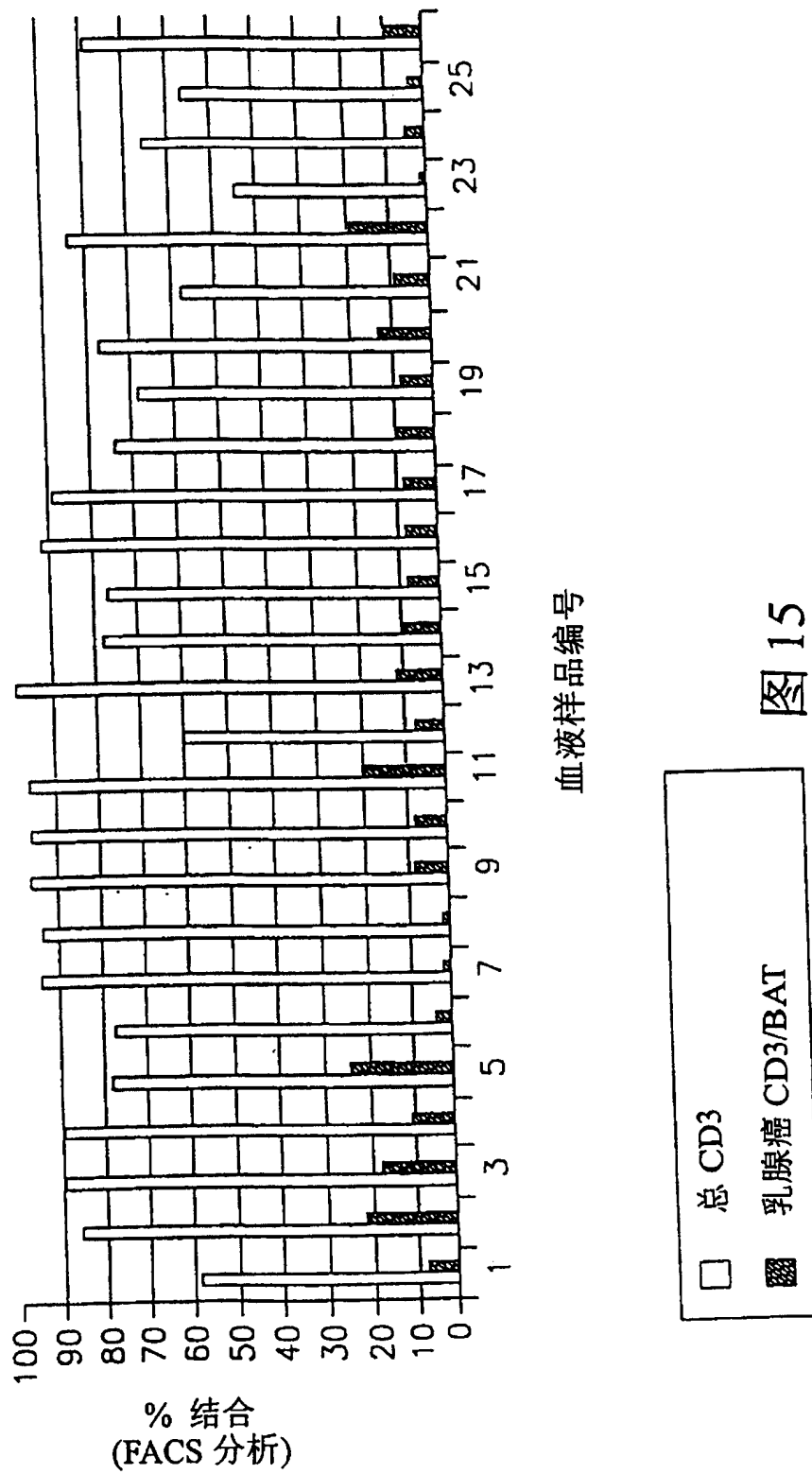
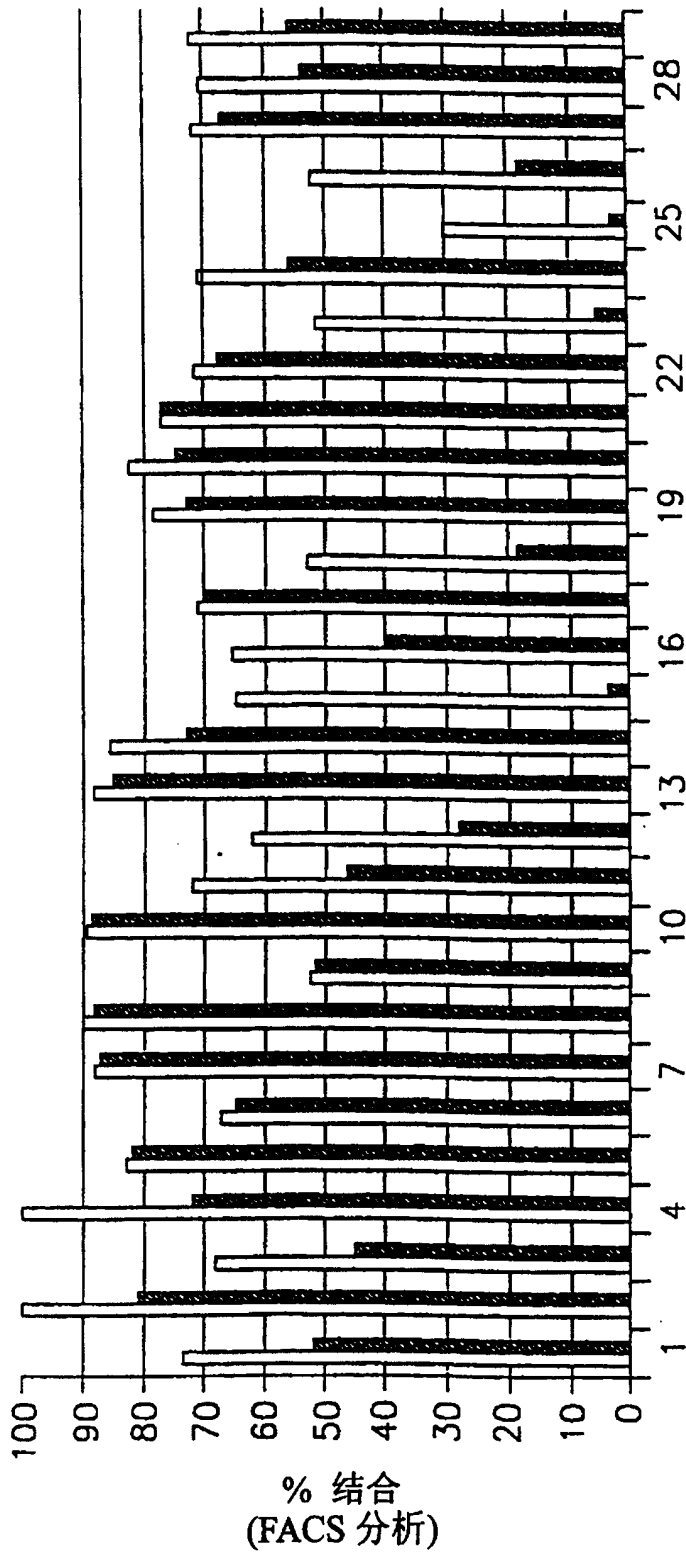
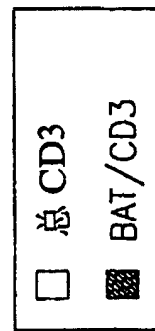


图 15



血液样品编号

图 16



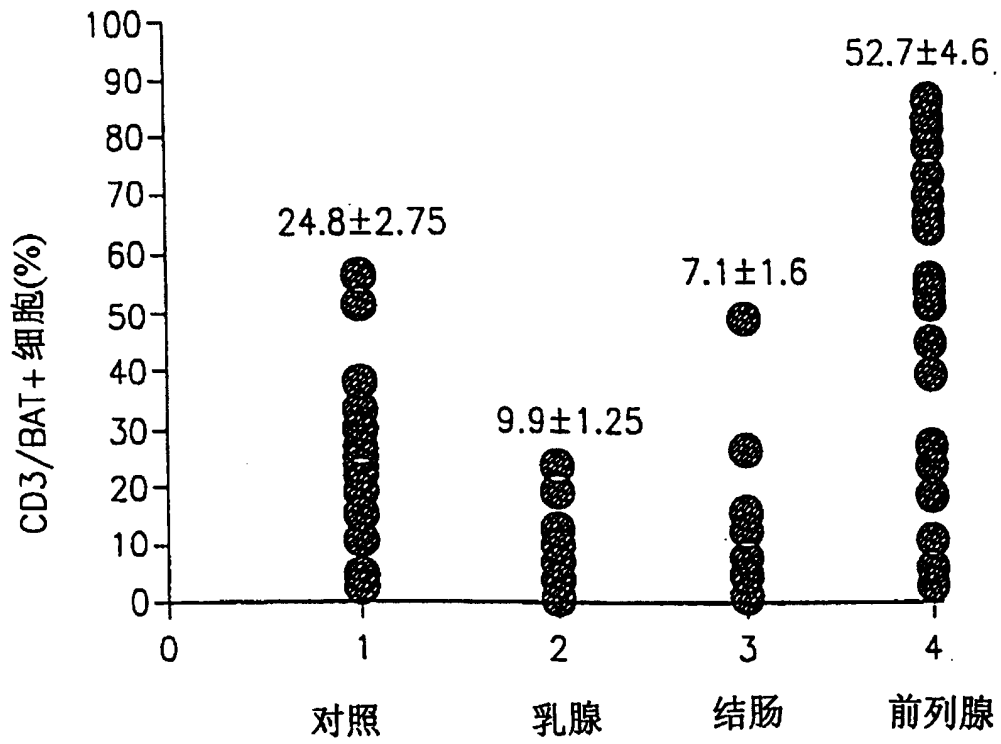


图 17

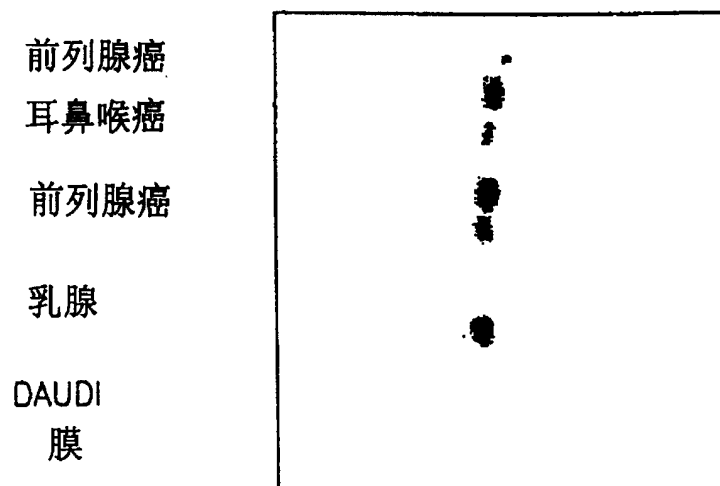


图 18